

**Université de Montréal**

**Régulation des récepteurs glutamatergiques dans différents  
modèles de vulnérabilité neuronale**

Par  
Barbara Valastro

Département de pharmacologie  
Faculté de médecine

Thèse présentée à la Faculté des études supérieures  
en vue de l'obtention du grade de  
Philosophiae Doctor (Ph.D)  
en pharmacologie

**Avril, 2003**

©, Valastro Barbara, 2003



w

4

U58

2004

v.002

## AVIS

L'auteur a autorisé l'Université de Montréal à reproduire et diffuser, en totalité ou en partie, par quelque moyen que ce soit et sur quelque support que ce soit, et exclusivement à des fins non lucratives d'enseignement et de recherche, des copies de ce mémoire ou de cette thèse.

L'auteur et les coauteurs le cas échéant conservent la propriété du droit d'auteur et des droits moraux qui protègent ce document. Ni la thèse ou le mémoire, ni des extraits substantiels de ce document, ne doivent être imprimés ou autrement reproduits sans l'autorisation de l'auteur.

Afin de se conformer à la Loi canadienne sur la protection des renseignements personnels, quelques formulaires secondaires, coordonnées ou signatures intégrées au texte ont pu être enlevés de ce document. Bien que cela ait pu affecter la pagination, il n'y a aucun contenu manquant.

## NOTICE

The author of this thesis or dissertation has granted a nonexclusive license allowing Université de Montréal to reproduce and publish the document, in part or in whole, and in any format, solely for noncommercial educational and research purposes.

The author and co-authors if applicable retain copyright ownership and moral rights in this document. Neither the whole thesis or dissertation, nor substantial extracts from it, may be printed or otherwise reproduced without the author's permission.

In compliance with the Canadian Privacy Act some supporting forms, contact information or signatures may have been removed from the document. While this may affect the document page count, it does not represent any loss of content from the document.

**Université de Montréal**  
**Faculté des études supérieures**

Cette thèse intitulée :

Régulation des récepteurs glutamatergiques dans différents modèles de  
vulnérabilité neuronale

présentée par :  
Barbara Valastro

a été évaluée par un jury composé des personnes suivantes :

Dr Chantal Lambert  
Président-rapporteur

Dr Guy Massicotte  
Directeur de recherche

Dr Jean-Claude Lacaille  
Membre du jury

Dr Joséphine Nalbantoglu  
Examineur externe

## Sommaire

Depuis quelques années, les affections du système nerveux central occupent une place importante dans les pays industrialisés. En effet, la maladie d'Alzheimer et le diabète mellitus sont des pathologies de plus en plus répandues et ce, subséquent au vieillissement de la population. Bien que les causes exactes de ces maladies demeurent inconnues, nous proposons qu'une mauvaise régulation des récepteurs pour le neurotransmetteur au glutamate soit à l'origine de ces atteintes cérébrales. Dans le but de vérifier cette hypothèse, nous avons examiné l'impact du diabète de type 1, présent chez les souris non obèse diabétique (NOD) prédisposée génétiquement à ce type de diabète, de même que l'absence de l'apolipoprotéine E (apoE) sur le système glutamatergiques. Utilisant la potentialisation à long terme (PLT) comme modèle expérimental de la mémoire, nous avons constaté que le statut anormal en apoE et le désordre métabolique observé lors du diabète étaient à même de modifier l'expression de ce phénomène électrophysiologique au niveau de la région CA1 de l'hippocampe. Sur le plan biochimique, cette perte de PLT serait corrélée, dans le cas du diabète, à l'altération des récepteurs N-méthyl-D-aspartate (RNMDA) alors que chez les souris déficientes en apoE, ce déficit serait plutôt associé à une mauvaise régulation des récepteurs  $\alpha$ -amino-3-hydroxy-5-methylisoxazole-4-propionique (RAMPA) par l'environnement lipidique.

Bien que les récepteurs glutamatergiques semblent bel et bien à l'origine des problèmes cognitifs présents chez les animaux atteints du diabète et de la maladie d'Alzheimer, notre compréhension des mécanismes cellulaires responsables de la régulation de ces récepteurs demeure incomplète. Puisque depuis quelques années on reconnaît aux inositols un rôle dans les processus de signalisation cellulaire et dans le mouvement des vésicules synaptiques, nous nous sommes intéressés à l'effet de certains inositols, et plus précisément de l'inositol hexakisphosphate (InsP6), sur la distribution subcellulaire des RAMPs et RNMDA. Selon notre étude, l'InsP6 favoriserait l'accumulation des RAMPs au niveau de la synapse et ce, au détriment des réserves intracellulaires. Puisque cet effet semble spécifique aux RAMPs, nous proposons que ce métabolite cellulaire affecte la neurotransmission excitatrice assurée par ces récepteurs et améliore la communication neuronale sous-jacente à la formation des souvenirs.

À la lumière des résultats obtenus, nous suggérons que les troubles cognitifs observés lors du diabète et de la maladie d'Alzheimer soient tributaires des modifications du système glutamatergique. De plus, puisque la concentration d'inositol varie dans ces deux pathologies et que cette molécule modifie les RAMPs, nous proposons que ces métabolites cellulaires soient à même de modifier le système glutamatergique et de contribuer aux processus d'apprentissage et de mémorisation.

**Mots clés :** Hippocampe, Maladie d'Alzheimer, Apolipoprotéine E, Plasticité, Diabète, Souris NOD, Inositol phosphate, Clathrine, Récepteur AMPA, Récepteur NMDA.

## Abstract

Throughout the years, the interest for Alzheimer's disease and diabetes has grown rapidly, especially with ageing of the population. Even though the exact causes of the neuronal vulnerability observed during these pathology are still unknown, we suggest that the cognitive disorders reported during these diseases might be related to the glutamatergic system, particularly to the regulation of AMPA and NMDA receptor. To verify this hypothesis, we examined whether brain glutamate receptors and long-term potentiation (LTP) were altered in the hippocampus of apolipoprotein E (apoE) knock-out mice, a model of Alzheimer's disease, as well as in non obese diabetic (NOD) mice, a genetic model of type 1 diabetes.

Our electrophysiological analyses demonstrated that the LTP induced in the CA1 hippocampal region by a theta-burst stimulation was lower for young apoE knock-out mice as well as for NOD mice. Moreover, this LTP defect in NOD mice was correlated to an increase in the N-méthyl-D-aspartate (NMDA) binding sites while it was associated to an impairment of  $\alpha$ -amino-3-hydroxy-5-methylisoxazole-4-propionique (AMPA) receptor regulation by the lipid environment for the apoE knock-out mice.

In order to understand the cellular mechanisms underlying glutamatergic receptor regulation, we studied the effect of different inositols, especially the D-myo-inositol-(1,2,3,4,5,6) hexakisphosphate (InsP6) which is one of the most abundant, on AMPA and NMDA receptor properties. In this study, we demonstrated that InsP6 specifically regulates AMPA receptor distribution between synaptic and microsomal fraction by promoting an accumulation of these receptors into the synapse, an effect that could be regulated by clathrin-dependant mechanisms.

Taken together, our results suggest that the cognitive disorders observed during diabetes and Alzheimer's disease are associated to a modification of AMPA and NMDA receptor regulation. Furthermore, since inositol phosphate concentration is altered in these pathologies and that InsP6 alters AMPA receptor modulation, we propose that inositol could affect the glutamatergic system and thereby be involved in learning and memory.

Key words: Hippocampus, Alzheimer's disease, Apolipoprotein E, Plasticity, Diabetes, NOD mice, Inositol phosphate, Clathrin, AMPA receptor NMDA receptor.



## Table des matières

<b>Sommaire.....</b>	<b>iii</b>
<b>Abstract .....</b>	<b>v</b>
<b>Table des matières.....</b>	<b>vii</b>
<b>Liste des tableaux .....</b>	<b>x</b>
<b>Liste des figures .....</b>	<b>xi</b>
<b>Liste des abréviations.....</b>	<b>xiii</b>
<b>Remerciements .....</b>	<b>xvi</b>
 <b>CHAPITRE 1-INTRODUCTION ET OBJECTIFS DE LA THÈSE .....</b>	 <b>1</b>
<b>Introduction.....</b>	<b>2</b>
Généralités .....	2
L'hippocampe et son importance dans les processus de mémorisation .....	3
Structures anatomiques de l'hippocampe .....	5
L'hippocampe et ses connexions intrahippocampales .....	7
De l'hippocampe à la potentialisation neuronale .....	7
 <b>Le glutamate et son rôle dans la neurotransmission excitatrice.....</b>	 <b>11</b>
Le glutamate .....	12
Classification et caractéristiques générales des récepteurs glutamatergiques .....	14
Les récepteurs ionotropes de type AMPA .....	17
Les récepteurs ionotropes sensibles au kaïnate .....	21
Les récepteurs ionotropes de type NMDA.....	22
Les récepteurs glutamatergiques de type métabotrope.....	23
Contribution des récepteurs glutamatergiques au phénomène d'excitotoxicité .....	26
 <b>La potentialisation à long terme (PLT) .....</b>	 <b>30</b>
Mécanisme d'induction de la PLT .....	30
Mécanisme d'expression et de maintien de la PLT .....	32
Régulation des récepteurs glutamatergiques lors de l'expression de la PLT .....	35
Les protéines kinases et les phosphatases.....	39
Les phospholipases .....	41
La calpaïne .....	43
Mouvement des récepteurs AMPA au niveau de la membrane synaptique .....	45
Endocytose des récepteurs AMPA .....	45

Insertion des récepteurs AMPA .....	47
<b>La potentialisation à long terme des systèmes inhibiteurs.....</b>	<b>48</b>
<b>La dépression à long terme .....</b>	<b>49</b>
La DLT de l'hippocampe .....	50
La DLT du cervelet .....	51
<b>Apolipoprotéine E, diabète et mémoire .....</b>	<b>53</b>
La maladie d'Alzheimer et le rôle de l'apolipoprotéine E .....	53
Le diabète mellitus .....	56
<b>Les inositols phosphates et leurs rôles à l'échelle du SNC .....</b>	<b>61</b>
<b>Hypothèses et Objectifs.....</b>	<b>65</b>
<b>CHAPITRE 2-Première partie-RÉGULATION DES RÉCEPTEURS GLUTAMATERGIQUES DE TYPE AMPA CHEZ DES SOURIS ADULTES ET ÂGÉES DÉFICIENTES EN APOLIPOPROTÉINE E. ....</b>	<b>68</b>
Abstract.....	70
Introduction.....	71
Materials and methods.....	73
Results .....	76
Discussion.....	79
References.....	83
Figure legends.....	87
<b>CHAPITRE 2-Deuxième partie-POTENTIALISATION À LONG TERME ET RÉGULATION DU SYSTÈME GLUTAMATERGIQUE CHEZ DES SOURIS PRÉDISPOSÉES GÉNÉTIQUEMENT AU DIABÈTE DE TYPE 1.....</b>	<b>95</b>
Abstract.....	97
Introduction.....	99
Materials and methods.....	101
Results .....	106
Discussion.....	109
References.....	114
Figure legends.....	118
<b>CHAPITRE 3-RÉGULATION DES RÉCEPTEURS GLUTAMATERGIQUES PAR L'INOSITOL HEXAKISPHOSPHATE (IP6). ....</b>	<b>127</b>
Abstract.....	129
Introduction.....	131
Materials and methods.....	134
Results .....	138
Discussion.....	143
References.....	148

Figure legends .....	153
<b>CHAPITRE 4-DISCUSSION GÉNÉRALE .....</b>	<b>164</b>
<b>Discussion .....</b>	<b>165</b>
Impact de la déficience en apolipoprotéine E sur la régulation des récepteurs AMPA .....	166
Influence des RNMDA lors du diabète de type 1 .....	170
Régulation des récepteurs au glutamate par les inositols polyphosphates .....	174
<b>Conclusion .....</b>	<b>179</b>
<b>RÉFÉRENCES.....</b>	<b>182</b>

## Liste des tableaux

### Chapitre 1

Tableau I. Propriétés moléculaires et pharmacologiques des récepteurs ionotropes.....	19
Tableau II. Propriétés moléculaires et pharmacologiques des récepteurs métabotropes.....	25
Tableau III. Caractéristiques structurales et fonctionnelles des protéines associées aux récepteurs glutamatergiques de type ionotrope.....	38
Tableau IV : Tableau synthèse des différentes kinases impliquées dans la régulation des récepteurs glutamatergiques de type ionotrope.....	40

### Chapitre 2

Table I. Basal 3H-AMPA binding in different brain structures of young and aged apoE-deficient mice.....	94
---	----

## Liste des figures

### Chapitre 1

Figure 1. L'hippocampe et ses connexions intrahippocampales.....	5
Figure 2. Représentation schématique des différentes couches présentes dans la formation hippocampale.....	6
Figure 3. Récepteurs glutamatergiques de type ionotrope et métabotrope.....	15
Figure 4. Structure d'une sous-unité composant les récepteurs glutamatergiques de type ionotrope.....	16
Figure 5. Représentation schématique du phénomène d'induction de la PLT.....	32
Figure 6. Représentation schématique de la densité postsynaptique.....	35
Figure 7. Mécanisme hypothétique responsable de la régulation des RAMPs par la phospholipase A <sub>2</sub> .....	42
Figure 8. Synthèse et dégradation des inositols polyphosphates.....	63

### Chapitre 2

Figure 1. Effect of phosphatidylserine on 3H-AMPA binding in mouse brain sections (Wipe Test).....	89
Figure 2. Effect of phosphatidylserine treatment on 3H-AMPA binding in mouse section. (Autoradiography).....	90
Figure 3. Effect of phosphatidylserine treatment on 3H-AMPA binding in different areas of mouse brain.....	91

Figure 4. Phosphatidylserine-induced increase of 3H-AMPA binding in brain section of young and aged apoE-deficient mice.....	92
--	----

Figure 5. LTP in area CA1 of hippocampus of young and aged apoE-deficient mice.....	93
---	----

### Chapitre 3

Figure 1A,B. NMDA receptor binding in NOD mice.....	121
---	-----

Figure 2A,B. Binding properties of NMDA receptor in the cortex formation of NOD mice.....	122
---	-----

Figure 3A,B. AMPA receptor binding in NOD mice.....	123
---	-----

Figure 4A,B. 3H-CNQX binding in NOD mice.....	124
---	-----

Figure 5A,B. Glutamate receptor subunits in NOD mice.....	125
---	-----

Figure 6. LTP magnitude in hippocampal slices of NOD mice.....	126
--	-----

### Chapitre 4

Figure 1. Modulation of AMPA receptor binding by InsP6.....	157
---	-----

Figure 2. Effect of InsP6 on binding properties of AMPA receptors in the hippocampus formation.....	158
---	-----

Figure 3. Effect of InsP6 on NMDA receptor binding.....	159
---	-----

Figure 4. Effect of InsP6 treatment on subcellular localization of glutamate receptor subunits.....	160
---	-----

Figure 5. Effect of heparin and Triton X-100 on InsP6-induced modulation of AMPA receptor.....	161
--	-----

Figure 6. Effect of various phosphate compound and InsS6 on GluR1 subunits.....	162
---	-----

Figure 7. Working model of InsP6-mediated modulation of AMPA receptor properties.....	163
---	-----

## Liste des abréviations

AA	Acide Arachidonique
AMPA	$\alpha$ -amino-3-hydroxy-5-methylisoxazole-4-propionique
AMPc	Adénosine monophosphate cyclique
ANOVA	Analyse of variance
ApoE	Apolipoprotéine E
ATP	Adenosine triphosphate
AVC	Accident vasculaire cérébral
$\beta$ A	Béta-Amyloïde
BAIC	Baicaleine
Bmax	Nombre de sites de liaison
CA	Corne d'Amon
CAMKII	Protéine kinase II $\alpha$ -Ca <sup>2+</sup> -calmoduline
CNQX	6-cyano 7-nitroquinoxaline-2,3-dione
DG	Gyrus dentelé
DLT	Dépression à long terme
DNQX	6,7-dinitroquinoxaline-2,3-dione
EDTA	Ethylenediaminetetraacetic acid
EGTA	Ethylene glycol-bis ( $\beta$ -Aminoethyl ether) N, N, N', N'-tetraacetic acid
ExtCx	Cortex externe
GRAN	Couche granulaire du cervelet
IntCx	Cortex interne
INDO	Indométacine
IP3	Inositol-1, 4,5-triphosphate
Kd	Constante d'affinité
KSCN	Potassium thiocyanate
mGluRs	Récepteurs métabotropes
MOL	Couche moléculaire du cervelet
NMDA	N-méthyl-D-aspartate
NOD	Non obèse diabétique
NON	Non obèse non diabétique
OR	stratum oriens
PLT	Potentialisation à long terme
PKC	Protéine kinase C
PLA <sub>2</sub>	Phospholipase A <sub>2</sub>

PLC	Phospholipase C
PMSF	Phenylmethylsulfonyl fluoride
PPSE	Potentiel postsynaptique exciteur
PS	Phosphatidylsérine
RAD	Stratum radiatum
RAMPA	Récepteur AMPA
RCPG	Récepteur couplé aux protéines G
RGLU	Récepteur au glutamate (ou glutamatergique)
RKA	Récepteur kaïnate
RNMDA	Récepteur N-Méthyl-D-Aspartate
ROD	Relative optical density
SDS-PAGE	Sodium dodecyl sulphate-polyacrylamide gel
SITS	4-acetanido-4'-isothiocyanato-stilbene-2,2'-disulfonic acid
SNC	Système nerveux central
STZ	Streptozotocine
TCPK	Tosylphenylalanylchloromethane
THAL	Thalamus



*À mes parents,  
Thomas et Ginette Valastro*

## Remerciements

Dans le cadre de mes études graduées, j'ai eu la chance et le privilège de travailler dans un environnement où régnait la camaraderie, le respect mutuel et surtout le professionnalisme scientifique. Cette chance, je la dois principalement à mon directeur de recherche, le Dr Guy Massicotte, qui m'a accueillie dans son laboratoire et qui m'a fait confiance dès le début. Durant toutes ces années, j'ai eu droit à un support constant et à de judicieux conseils de ta part Guy et je t'en remercie!

Aussi, j'ai eu la chance de travailler avec des personnes exceptionnelles : Caro, Judith, Karine, Nathalie, vous avez toutes marqué mon passage dans le labo à votre façon et je vous remercie pour ces innombrables bons moments. Il y a aussi les voisins masculins, Keith, Ben et Bruno, avec qui j'ai bien ri autant au labo que lors de nos petites soirées! Je tiens aussi à souligner l'appui moral de mes amies, Catherine, Stéphanie, Fannie, Caroline et Sylvie, avec qui j'ai longuement discuté des hauts et des bas de la vie de laboratoire. Finalement, je désire à témoigner ma reconnaissance au Dr Michel Baudry qui m'a accueillie dans son laboratoire de l'University of Southern California (USC) à l'été 2001, ainsi qu'au Dr Maria Grazia Martinoli pour nos collaborations sur différents projets.

Aussi, je ne peux passer sous silence l'apport de Luc Marchand à ma formation. Tes histoires loufoques m'ont bien fait rire et ton support dans le laboratoire restera à jamais gravé dans ma mémoire.

Je tiens aussi à remercier le Dr Massicotte, le Conseil de Recherche en Sciences Naturelles et en Génie du Canada (CRSNG), le Fond de la Recherche en Santé du Québec (FRSQ), l'Association Diabète Québec (ADQ) ainsi que la compagnie Merck Frosst pour le soutien financier qu'ils m'ont apporté à différentes étapes de ma formation.

Pour terminer, je tiens à témoigner toute ma gratitude à ma famille, et plus particulièrement à mes parents pour leurs supports moral et financier de même que pour leur très grande patience. Je n'ai pas choisi les études les plus courtes ni les plus faciles, mais vous avez toujours été là pour me féliciter lors des moments joyeux, ou me reconforter lors des périodes plus difficiles. Vous avez toujours respecté mon choix et je vous en remercie.

*Merci  
Barb*

# **CHAPITRE 1**

## **INTRODUCTION**

**ET**

## **OBJECTIFS DE LA THÈSE**

## Introduction

### *Généralités*

Malgré les nombreux progrès réalisés dans le domaine des neurosciences, le cerveau demeure un organe complexe dont la compréhension évolue de jours en jours. Bien qu'il soit responsable du bon fonctionnement de l'organisme, le cerveau est aussi le site d'apparition de plusieurs maladies neurodégénératives qui vont mener progressivement à la détérioration des fonctions cérébrales supérieures. Dans cet ouvrage, nous nous sommes principalement intéressés aux déficits cognitifs observés lors de la maladie d'Alzheimer et du diabète de type 1, et plus particulièrement à l'impact de ces pathologies sur le système glutamatergique présent dans l'hippocampe.

Afin de bien situer les lecteurs, nous ferons un rapide survol des caractéristiques physiopathologiques de ces deux maladies mais, tout d'abord, nous réviserons dans la première partie de l'introduction les caractéristiques de la structure hippocampale et du système glutamatergique, de même que leurs rôles respectifs dans les mécanismes de potentialisation et de dépression à long terme (PLT et DLT). De plus, puisque nous suggérons que les myo-inositols puissent affecter les caractéristiques du système glutamatergique, une section de l'introduction sera consacrée à la description

de ces métabolites cellulaires responsables du bon fonctionnement du SNC. Une fois ces bases établies, les chapitres deux et trois seront consacrés à la présentation des résultats obtenus lors de nos études électrophysiologiques et biochimiques conduites sur différents modèles animaux. Finalement, la dernière partie de cet ouvrage sera entièrement dédiée à la discussion et à l'intégration de l'ensemble des résultats obtenus. Vu l'intérêt croissant accordé au système glutamatergique dans le domaine pharmaceutique, nous espérons par ces observations avoir démontré l'importance de ce système excitateur dans les processus d'apprentissage et de mémorisation.

### ***L'hippocampe et son importance dans les processus de mémorisation***

La plupart des connaissances que nous accumulons au cours de notre vie sont acquises par l'expérience et maintenues grâce à la mémoire. Toutefois, le processus de mémorisation n'est pas seulement une méthode d'enregistrement; il permet à l'humain de s'instruire et de transmettre des informations de génération en génération. Bien que cette propriété du système nerveux centrale (SNC) soit bénéfique, la mémoire peut aussi être responsable des troubles psychologiques et émotionnels menant à la perte de son identité et de sa propre histoire.

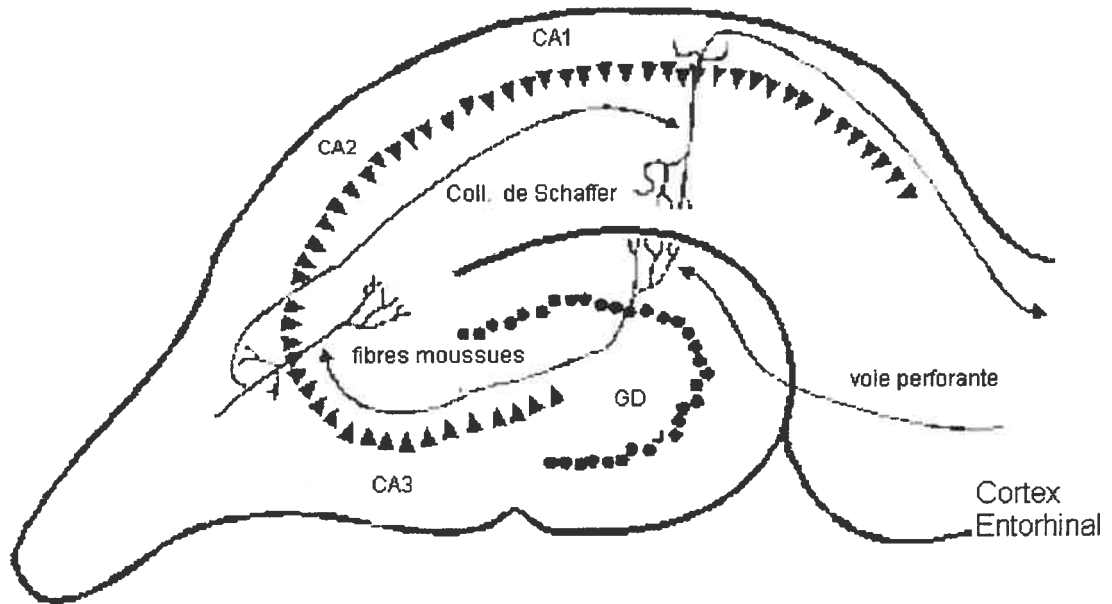
Bien qu'il existe encore des incertitudes quant au nombre de systèmes impliqués dans le phénomène de mémorisation, les chercheurs se sont mis d'accord sur la terminologie à utiliser pour désigner ce processus mnésique. Dans un premier cas, la mémoire des événements, des visages et des idées est nommée mémoire déclarative. Plus précisément, elle réfère aux souvenirs conscients qui peuvent être déclarés,

c'est-à-dire exprimés sous la forme de propositions verbales. Dans un deuxième cas, la mémoire non verbale est associée à la mémoire des habiletés physiques c'est-à-dire qu'elle réfère à des souvenirs non conscients comme le fait de rouler à bicyclette ou encore de marcher. Lors de l'apprentissage, ces gestes nécessitent beaucoup d'attention et de concentration mais une fois acquises, ces habiletés sont stockées sous forme de mémoire non déclarative. Par exemple, il n'est pas nécessaire de se rappeler consciemment de mettre un pied devant l'autre lorsque l'on se déplace.

Telles que décrites ci-dessus, les caractéristiques de la mémoire déclarative et non déclarative sont bien définies. Toutefois, il en est autrement pour leur localisation à l'intérieur du SNC. Dans le cas de la mémoire non déclarative, le stockage de ce type d'information se fait au niveau de l'amygdale, du cervelet et du striatum. Concernant la mémoire déclarative, la perception et le traitement de ces données nécessitent l'implication de plusieurs aires corticales. Par exemple, une région précise du SNC serait impliquée dans le traitement de la couleur de l'objet à mémoriser alors qu'une autre serait responsable de sa forme. Par la suite, ces différentes aires corticales sont reliées entre elles par une région du lobe temporel interne dans le but de former une représentation globale de l'objet; il s'agit de l'hippocampe. Selon cette conception, l'hippocampe permettrait aux aires corticales d'être interconnectées pour une période de temps allant de quelques jours à quelques mois, et ce afin de consolider l'information qui sera par la suite emmagasinée à très long terme. C'est d'ailleurs pour cette raison que des lésions de l'hippocampe n'altèrent pas les souvenirs datant de plusieurs années.

## Structures anatomiques de l'hippocampe

L'hippocampe, cette formation hautement spécialisée présente sur la face interne du lobe temporal, est formé de deux structures s'emboîtant l'une dans l'autre : la corne d'Ammon (CA) et le gyrus dentelé. Composée essentiellement de cellules pyramidales et d'interneurones, la corne d'Amon est subdivisée en quatre parties distinctes nommées CA1, CA2, CA3 et CA4, lesquelles sont caractérisées selon la morphologie des cellules qui y sont retrouvées (Figure 1).



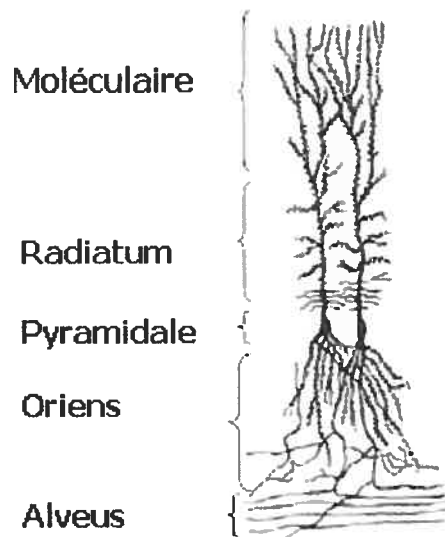
**Figure 1 : L'hippocampe et ses connexions intrahippocampales**  
(adaptée de O'Keefe and Nadel, 1978)

Par exemple, la région CA1 est constituée d'une double rangée de cellules pyramidales isolées de taille moyenne alors que des cellules larges et denses sont retrouvées dans la région CA2 hippocampale. Quant au gyrus dentelé, cette structure



est la porte d'entrée de l'information provenant du cortex entorhinal et elle est composée principalement des cellules granulaires et des cellules baskets de Cajal.

Sur le plan organisationnel, les caractéristiques morphologiques des cellules de l'hippocampe permettent de séparer cette structure en cinq régions. De l'extérieur vers l'intérieur, on retrouve l'*alveus*, composé des axones des cellules pyramidales, la couche *oriens* où sont présentes les dendrites et les interneurones, et la couche *pyramidale*, contenant les corps cellulaires des cellules pyramidales. Finalement, les deux dernières couches sont nommées couche *radiatum* et *lacunosum/moleculare* où l'on retrouve respectivement les segments proximaux et distaux de l'arbre dendritique (Figure 2) (O'Keefe and Nadel 1978).



**Figure 2 : Représentation schématique des différentes couches présentes dans la formation hippocampale (adaptée de O'Keefe and Nadel, 1978)**

**Cellule pyramidale  
de la région CA1**

## **L'hippocampe et ses connexions intrahippocampales**

Tel que mentionné précédemment, l'une des principales fonctions de l'hippocampe est de relier les différentes aires corticales impliquées dans le stockage de l'information. Pour se faire, l'information entre et sort de la structure hippocampale par l'intermédiaire de trois voies excitatrices. La première, la voie perforante, origine du cortex entorhinal et se termine au niveau des cellules granulaires du gyrus dentelé. La deuxième, la voie des fibres moussues, relie les cellules granulaires présentes dans le gyrus dentelé aux dendrites des cellules pyramidales de la région CA3 et finalement, la troisième, la voie des collatérales de Schaffer, relie les cellules pyramidales de la région CA3 aux dendrites apicales de la région CA1. Par la suite, la communication avec les autres aires corticales est assurée par les cellules de la région CA1 dont les prolongements vont atteindre le thalamus puis être redirigés vers les aires appropriées (Figure 1).

## **De l'hippocampe à la potentialisation neuronale**

Les premiers indices concernant l'implication de l'hippocampe dans les processus de mémorisation proviennent d'un patient épileptique connu sous le nom de HM. Suite à une intervention chirurgicale qui le priva de son hippocampe, les spécialistes ont vite constaté que l'ablation de cette structure altérerait grandement la mémoire de ce patient. Par la suite, différents examens neurologiques menés par la psychologue Brenda Milner de l'Institut neurologique de Montréal ont décelé que le patient était incapable d'emmagasiner de nouvelles informations mais qu'il était apte à

se souvenir de certains événements survenus précocement dans sa vie. C'est d'ailleurs avec ce diagnostic d'amnésie antérograde que les scientifiques ont proposé que l'hippocampe soit indispensable à la consolidation et au stockage de nouvelles informations (Purves and Roucoux 1999).

Bien que cette chirurgie ait permis de mieux comprendre l'implication de l'hippocampe dans la formation des nouveaux souvenirs, les mécanismes cellulaires responsables de leur encodage n'ont été découverts qu'en 1973 par Tim Bliss et Terje Lomo (Bliss and Lomo 1973). Conscients de l'importance des travaux réalisés par le Dr Milner sur le patient HM, ces chercheurs ont tenté de comprendre de quelle façon les neurones de l'hippocampe pouvaient stocker et consolider l'information. Ils ont alors démontré *in vivo* que l'application d'une stimulation électrique de haute fréquence (SHF) au niveau des neurones présynaptiques du gyrus dentelé augmentait la transmission synaptique pendant des heures, des jours, et même des semaines si la stimulation était répétée plusieurs fois (Bliss and Lomo 1973). Sur la base de ces expériences, ces deux chercheurs ont réussi à démontrer le postulat de David Hebb datant des années 40 qui suggérait que :

« Lorsqu'un axone d'une cellule A excite une cellule B et joue un rôle dans sa décharge de façon répétée ou persistante, certains processus de développement ou certaines modifications métaboliques surviennent dans une ou dans les deux cellules de telle façon que l'aptitude de A à exciter B est augmentée » (Squire and Kandel 2002).

Dès lors, ce phénomène de facilitation ou de renforcement synaptique démontré par Bliss et Lomo a été nommé potentialisation à long terme (PLT).

Plusieurs caractéristiques font de la PLT un mécanisme de stockage approprié. Tout d'abord, elle se produit dans les trois voies excitatrices responsables de la circulation de l'information dans l'hippocampe. Ensuite, elle est rapidement déclenchée par une stimulation de haute fréquence et finalement, une fois induite, elle est stable pendant plusieurs heures et même plusieurs jours. Bien qu'elle ait été découverte dans l'hippocampe de lapin, la PLT peut être induite dans l'ensemble du cerveau et plus particulièrement dans le néostriatum, le néocortex et l'amygdale (Uno and Oza-wa 1991; Ikegaya *et al.*, 1995).

Tel que décrit par Bliss et Lomo, la PLT est considérée comme étant un mécanisme de renforcement synaptique. Toutefois, si les synapses ne faisaient que se renforcer, le système serait rapidement saturé et le stockage de nouvelles informations serait très difficile, voire même impossible. Par ailleurs, cette abondance de synapse active faciliterait l'apparition de désordres neurologiques importants tels que l'épilepsie. Dans le but de prévenir ce déséquilibre neuronale et de rendre le système de renforcement synaptique efficace, un mécanisme responsable de l'affaiblissement des synapses est présent dans certaines régions cérébrales; il s'agit de la dépression à long terme (DLT). Les premières données expérimentales concernant la DLT ont démontré que ce phénomène électrophysiologique était associé à une perte de sensibilité des récepteurs non-NMDA présents sur les cellules de Purkinje du cervelet (Ito and Kano 1982; Ito *et al.*, 1982). Au niveau de l'hippocampe, la DLT est induite au niveau des collatérales de Schaffer et elle se manifeste suite à l'application d'une stimulation de basse fréquence (1Hz) pendant 10 à 15 minutes. Tout comme dans le cervelet, ce phénomène hippocampale aura comme conséquence une diminution de

l'efficacité de la synapse à propager l'influx nerveux ce qui contribuerait à l'élimination des souvenirs.

Bien que l'expression de ces phénomènes électrophysiologiques impliquent l'activation de mécanismes cellulaires différents, ils réfèrent tous les deux à la capacité qu'ont les neurones de s'adapter dans différentes conditions physiologiques. Ce phénomène, nommé plasticité synaptique, inclue à la fois la PLT et la DLT et nous reviendrons sur leurs propriétés respectives dans une section ultérieure.

## Le glutamate et son rôle dans la neurotransmission excitatrice

Depuis la découverte par le neuroanatomiste Santiago Ramon y Cajal que les neurones communiquent entre eux par des points de contact nommés synapses, le mécanisme responsable de la transmission de l'information entre l'élément présynaptique et postsynaptique a suscité beaucoup d'intérêt. Puisque le courant électrique ne peut franchir l'espace entre les deux neurones, il provoque la libération d'un médiateur chimique nommée neurotransmetteur. Au fil des ans, plusieurs études ont démontré que la majorité des messagers neurochimiques présents dans le SNC étaient à même d'influencer les processus d'apprentissage et de mémorisation, et ce même si ces messagers possèdent des caractéristiques spécifiques et des degrés d'efficacité différents. À titre d'exemple, des études réalisées sur des patients atteints de la maladie d'Alzheimer ont démontré que trois systèmes de neurotransmetteur étaient affectés par cette pathologie ce qui confirme l'importance de ces molécules dans les processus mnésiques.

Les premières études réalisées dans le but de cibler le système de neurotransmetteur responsable des problèmes de mémorisation ont désigné le système cholinergique comme étant le grand responsable de ces atteintes. Par exemple, dans la maladie d'Alzheimer, la diminution de la choline acétyltransférase de même qu'une diminution de la recapture de l'acétylcholine (ACh) suggèrent que cette substance soit responsable des déficits mnésiques observés lors de cette pathologie (Francis *et al.*, 1999). Parallèlement, une autre hypothèse, celle-ci basée sur le système glutamatergique, a aussi été avancée dans le cas de cette maladie. Plus précisément, il a été dé-

montré que la concentration du glutamate était diminuée de 14% lors des biopsies du lobe temporal et que cette diminution était encore plus importante lors des études *post-mortem* (Francis *et al.*, 1999). De plus, la présence d'enchevêtrements neurofibrillaires caractéristiques de cette pathologie ont été retrouvés dans les neurones pyramidaux responsables de la synthèse des acides aminés excitateurs dont fait partie le glutamate. Suite à l'obtention de ces résultats, il a été suggéré que l'hypothèse glutamatergique était aussi importante que l'hypothèse cholinergique. Dès lors, une attention grandissante a été consacrée au rôle du glutamate dans la neurotransmission excitatrice de même qu'à son implication dans la neurodégénérescence de type Alzheimer (Lee *et al.*, 2002).

Dans les prochaines sections, nous nous attarderons aux caractéristiques biochimiques et fonctionnelles du système glutamatergique afin de démontrer qu'une mauvaise régulation de ce système puisse être à l'origine des problèmes d'apprentissage et de mémorisation retrouvés lors de certaines pathologies humaines.

### ***Le glutamate***

Le glutamate est un acide aminé abondamment retrouvé dans le SNC qui satisfait très bien aux critères définissant un neurotransmetteur, c'est-à-dire : A) être présent dans le neurone présynaptique, B) être libéré suite à une dépolarisation présynaptique dépendante du calcium, et C) agir sur des récepteurs spécifiques au niveau postsynaptique (Purves and Roucoux 1999).

Retrouvé à l'intérieur du terminal présynaptique, le glutamate est synthétisé suite à la transformation de la glutamine par la glutaminase. Une fois libéré dans la fente synaptique, le neurotransmetteur va se lier à son récepteur présent au niveau postsynaptique et provoquer la transmission du signal. Suite à cette action, le glutamate est retiré de la fente synaptique par des transporteurs spécifiques retrouvés à la fois au niveau des cellules gliales et du terminal présynaptique. Une fois à l'intérieur de ces cellules, le glutamate sera reconvertie en glutamine par la glutamine synthétase, puis la glutamine sera transférée, toujours via les transporteurs, dans l'élément présynaptique où elle servira à la production du neurotransmetteur glutamate. De cette façon, les cellules gliales et les terminaisons synaptiques coopèrent pour assurer un approvisionnement adéquat en neurotransmetteurs.

Normalement, l'interaction entre le glutamate et son récepteur se fait rapidement et il en est de même pour son élimination de la fente synaptique. Toutefois, lorsque le processus naturel est altéré, le glutamate s'accumule dans la fente synaptique et stimule de façon excessive les récepteurs. Ce phénomène nommé excitotoxicité serait responsable de la dégénérescence neuronale observée dans plusieurs maladies dont la maladie d'Huntington, la sclérose amyotrophique latérale et les accidents vasculaires cérébraux (AVC) (Heath and Shaw 2002; Lynch and Guttman 2002). Vu l'ampleur de ce phénomène, nous y reviendrons ultérieurement.

Bien que glutamate puisse être neurotoxique, son implication dans les processus de mémorisation et d'apprentissage est beaucoup plus importante dans la vie de tous les jours. D'ailleurs, plusieurs études réalisées sur de jeunes rats en santé ont démontré l'implication de ce neurotransmetteur dans les processus de mémorisation



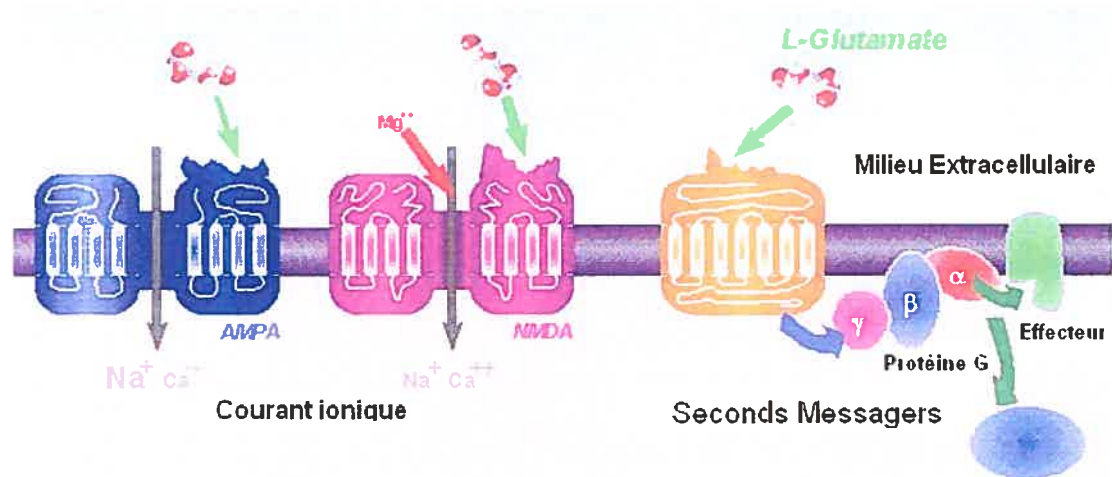
(Myhrer 2003). Sur le plan expérimental, il a été démontré que l'utilisation d'antagonistes dirigés contre les récepteurs au glutamate empêchait l'acquisition de nouvelles informations de même que leur récupération par l'animal. Par exemple, l'administration systémique de MK-801 et de kétamine de même que l'injection intracérébrovasculaire d'AP5 semble affecter les performances des animaux dans le labyrinthe de Morris et celui en forme de T (Morris *et al.*, 1986; Alessandri *et al.*, 1989; Wesierska *et al.*, 1990; Bischoff and Tiedtke 1992; Bolhuis and Reid 1992; Ahlander *et al.*, 1999). Concernant ces deux tests comportementaux, le labyrinthe de Morris a été développé dans le but de vérifier l'état des mécanismes responsables de l'orientation l'espace alors que le labyrinthe en forme de T permet l'évaluation de la mémoire de travail. Puisque l'utilisation d'antagonistes glutamatergiques affecte le comportement des animaux dans ces labyrinthes, il est suggéré que le neurotransmetteur glutamate joue un rôle important dans les processus de mémorisation.

### ***Classification et caractéristiques générales des récepteurs glutamatergiques***

Tel que mentionné précédemment, la communication entre deux neurones nécessite la présence d'un neurotransmetteur et de son récepteur spécifique. Dans le cas du glutamate, ce messenger chimique va activer une gamme complexe d'unités réceptrices, les récepteurs glutamatergiques (RGLU), qui sont divisés en deux grandes catégories : les récepteurs ionotropes et les récepteurs métabotropes (Figure 3).

Localisés au niveau postsynaptique, les récepteurs glutamatergiques de type ionotrope sont caractérisés comme étant des canaux ioniques transmembranaires dont la sélectivité et la perméabilité varient selon le récepteur étudié. Séparés en trois sous-types d'après leurs affinités pour les différents agonistes glutamatergiques, on retrouve les récepteurs N-méthyl-D-aspartate (RNMDA), les récepteurs  $\alpha$ -amino-3-hydroxy-5-méthyl-4-isoxazolepropionate (RAMPA) et les récepteurs sensibles au kaïnate (RKA) (Dingledine *et al.*, 1999).

Concernant les récepteurs glutamatergiques de type métabotrope (mGluRs), ce sont des protéines monomériques qui appartiennent à la famille des récepteurs couplés aux protéines G (RCPG). Une fois stimulée par le neurotransmetteur, la protéine G liée au domaine C-terminal du récepteur se dissocie et module, de façon directe ou indirecte, la conductance des canaux ioniques (Anwyl 1999; Dale *et al.*, 2002).

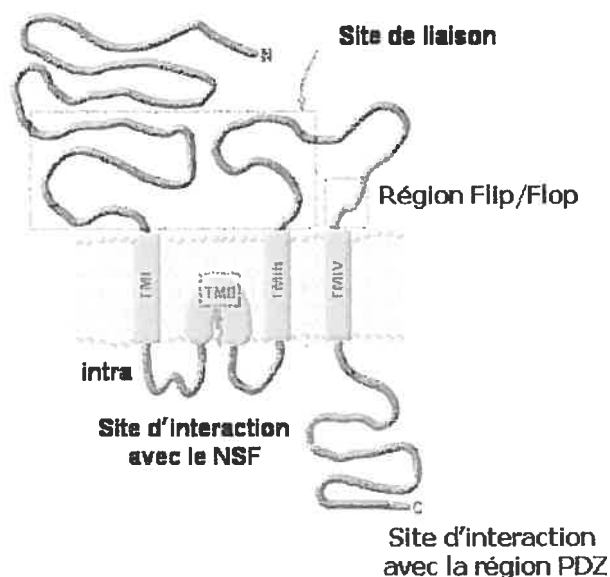


**Figure 3. Récepteurs glutamatergiques de type ionotrope et métabotrope.**

À ce jour, une grande diversité moléculaire existe au sein des récepteurs ionotropes et métabotropes. Tout d'abord, quatre sous-unités différentes ont la possibilité de former un RAMPA (GluR1-4) tandis qu'on en compte cinq pour les RNMDA (NR1, NR2A-D, NR3A) et cinq pour les RKA (GluR5-7, KA1-2) (Tableau I; p19). Dans le cas des récepteurs métabotropes, huit types de récepteurs différents (mGluR1-8) ont été décrit, lesquels sont repartis dans trois grands groupes selon leur caractéristiques fonctionnelles (Ozawa *et al.*, 1998) (voir le Tableau II; p.25).

### Les récepteurs glutamatergiques de type ionotrope.

Bien qu'il existe encore des incertitudes quant au nombre de sous-unités qui composent le récepteur au glutamate, elles ont toutes une structure similaire c'est-à-dire qu'elles possèdent un large domaine N-terminal extracellulaire, quatre segments membranaires (M1-4), dont le segment M2 est intramembranaire, et finalement un domaine C-terminal intracellulaire (Figure 4).



**Figure 4. Structure d'une sous-unité composant les récepteurs glutamatergiques de type ionotrope.**

Concernant le site de liaison du neurotransmetteur, il se situe entre les segments S1 et S2 pour tous les récepteurs glutamatergiques de type ionotrope. Malgré le fait que ces récepteurs arborent des caractéristiques structurales similaires, ils possèdent des propriétés biochimiques, physiologiques et pharmacologiques spécifiques et c'est ce dont il sera question dans les prochaines sections.

### **Les récepteurs ionotropes de type AMPA**

Les récepteurs ionotropes de type AMPA sont reconnus comme étant des canaux ioniques ligand-dépendants responsables de la neurotransmission excitatrice. Présents dans la majorité des structures cérébrales, ces récepteurs s'ouvrent, se ferment et se désensibilisent rapidement suite à la liaison du neurotransmetteur glutamate ce qui permet la propagation de l'influx nerveux.

En ce qui a trait à la répartition de ces récepteurs à l'échelle du SNC, des études de liaison utilisant le ligand radioactif 3H-AMPA ont démontré que l'hippocampe était une structure où la densité de liaison était très importante, et que des différences régionales étaient présentes à l'intérieur même de cette structure. Plus précisément, il a été rapporté que la région CA1 de l'hippocampe liait davantage le 3H-AMPA que la région CA3 et que des différences de liaison étaient aussi présentes entre les couches oriens et radiatum (Monaghan *et al.*, 1984). De plus, des AMPA ont aussi été localisés au niveau du cortex, du striatum, du thalamus et du cervelet mais la quantité présente est moins importante qu'au niveau de l'hippocampe (Monaghan *et al.*, 1984).

Tel que mentionné précédemment, les récepteurs AMPA sont reconnus comme étant des récepteurs ligands-dépendants, c'est-à-dire qu'ils doivent lier une molécule agoniste ou antagoniste pour générer une action postsynaptique. Pour se faire, trois sites de liaison ont été rapportés à même ces récepteurs dont un pour le glutamate et deux autres impliqués dans la modulation de la réponse synaptique. Concernant le site de liaison du glutamate, il possède deux états d'affinité pour le neurotransmetteur (Standley *et al.*, 1998). Les sites de basse affinité seraient surtout présents au niveau de l'hippocampe et localisés à l'échelle des couches oriens et radiatum, alors que ceux de haute affinité seraient retrouvés sur les corps cellulaires et dans la couche pyramidale (Standley *et al.*, 1998). D'après une étude réalisée par Tocco et ses collaborateurs, ces différences d'affinité seraient attribuables à l'environnement lipidique du récepteur et non pas à la composition du récepteur en sous-unités (Tocco *et al.*, 1992). Pour ce qui est des deux autres sites de liaison, ils sont principalement impliqués dans la modulation de la réponse. Par exemple, la liaison d'une molécule de cyclothiazide ou d'aniracétam au récepteur AMPA va ralentir sa désensibilisation alors que la liaison d'un antagoniste non compétitif va accélérer ce processus. Finalement, d'autres molécules pourraient se lier à même le canal et bloquer la transmission synaptique impliquant les récepteurs AMPA (ex : Joro spider toxin) (Iino *et al.*, 1996).

Dans le même ordre d'idée, plusieurs agonistes et antagonistes sont à ce jour commercialisés pour l'étude des récepteurs AMPA. Parmi les agonistes, on retrouve le glutamate, la clé pharmacologique AMPA, le quisqualate, le kainate et le domoate

alors qu'on le CNQX, le DNQX et le NBQX sont utilisés en tant qu'antagonistes (Tableau I).

Types de récepteur	Sous-unités	Agonistes	Antagonistes	Bloqueur du canal
<b>AMPA</b>	GluR1-4	Glutamate	CNQX	Barbiturates Joro spider toxin (JST)
		AMPA	DNQX	
		Quisqualate	NBQX	
		Kainate		
<b>Kainate</b>	GluR5-7 KA1-2	Domoate		
		Glutamate	CNQX	
		AMPA	DNQX	
		Kainate	NBQX	
<b>NMDA</b>	NR1 NR2a-e NR3	A. acromelique A et B		
		AMPA		
		Glutamate	2-AP5	ion $Mg^{2+}$
		NMDA	2-AP7	MK-801
		Acide ibotenique	CPP	PCP
		Acide L-homocysteique		Ketamine
		Acide quinolinique		

**Tableau I. Propriétés moléculaires et pharmacologiques des récepteurs ionotropes (Bi *et al.*, 1998; Michaelis 1998; Dingledine *et al.*, 1999).**

Une fois leur synthèse terminée, les RAMPAs sont composés de quatre sous-unités (GluR1-4) qui sont identiques, dans le cas des récepteurs homomériques, ou différentes dans le cas des récepteurs hétéromériques (Hollmann and Heinemann 1994). Par exemple, des récepteurs homomériques formés des sous-unités GluR1, GluR3 et GluR4 ont été rapportés dans plusieurs régions cérébrales et auraient comme particularité d'être perméables aux ions calcium, magnésium et barium (Verdoorn *et al.*, 1991). Dans le cas des récepteurs hétéromériques, l'association des sous-unités GluR1-GluR2 et GluR2-GluR3 serait principalement retrouvée dans

l'hippocampe alors que la combinaison GluR2-GluR3 serait aussi présente au niveau des cellules de Purkinje (Song and Huganir 2002). En ce qui a trait à la sous-unité GluR2, les récepteurs formés de cette sous-unité seraient non-perméables au calcium. Cette caractéristique spécifique serait tributaire de la présence d'un acide aminé chargé positivement (arginine) dans le segment M2 du récepteur (Michaelis 1998) et attribuerait aux récepteurs AMPA la propriété d'être perméable au calcium. Par conséquent les neurones exprimant ce type de récepteur seraient plus vulnérables à la toxicité induite par le glutamate (Pellegrini-Giampietro *et al.*, 1992).

Pour terminer, les récepteurs AMPA possèdent deux petites subtilités moléculaires qui leur confèrent des caractéristiques particulières. Tout d'abord, la longueur du domaine C-terminal peut varier d'une sous-unité à l'autre. Par exemple, les sous-unités GluR1, GluR4 et GluR2L ont un domaine C terminal plus long que les sous-unités GluR2c, GluR3 et GluR4c (Song and Huganir 2002). Cette caractéristique structurale jouerait un rôle précis dans la régulation des récepteurs AMPA et plus particulièrement dans leur interaction avec les protéines d'ancrage présentes au niveau cellulaire. Ensuite, les quatre sous-unités composants les RAMPs sont retrouvés sous deux formes différentes soit la version flip ou flop. Cette terminologie associée uniquement aux sous-unités du RAMPa réfère à une séquence d'acides aminés présente avant le segment transmembranaire M4 des sous-unités (Figure 4) (Sommer *et al.*, 1990). Bien que l'expression de l'une ou l'autre des formes soit liée au développement, il a été démontré que la version flop était davantage présente chez le cerveau adulte et que la version flip serait associée à une transmission neuronale plus importante (Dingledine *et al.*, 1999).

## Les récepteurs ionotropes sensibles au kaïnate

Les récepteurs sensibles au kaïnate (RKA) sont des protéines transmembranaires abondamment retrouvées dans la région CA3 de l'hippocampe et dans la couche granulaire du cortex cérébelleux. Par le passé, l'étude de ce type de récepteur était très difficile puisqu'aucun outil pharmacologique n'était capable de les différencier des AMPA. D'ailleurs, ces deux types de récepteurs étaient regroupés sous le nom de « récepteurs ionotropes non-NMDA » et ce jusqu'à ce qu'il soit démontré que l'affinité des sous-unités GluR5, GluR6, GluR7, KA1 et KA2 était une plus forte pour la molécule de kaïnate que pour l'AMPA. De plus, la découverte de molécules plus spécifiques aux RKA a permis de mieux caractériser les différences entre ces deux canaux ioniques (Michaelis 1998).

Tout comme les récepteurs AMPA, les RKA sont présents dans les membranes synaptiques sous la forme d'homo ou d'hétérotétramères. Bien que les sous-unités GluR5, GluR6 et GluR7 forment des récepteurs homomériques fonctionnels, il en est autrement pour les sous-unités KA1 et KA2 qui seraient retrouvées uniquement sous la forme hétéromérique (Lerma *et al.*, 2001). Toutefois, même si les récepteurs homomériques formés des sous-unités GluR5 et GluR6 sont fonctionnels, ils seraient rapidement désensibilisés lors d'une application continue de kaïnate (Lerma *et al.*, 2001).

Sur le plan fonctionnel, les récepteurs kaïnates postsynaptiques présents au niveau des fibres moussues de la région CA3 de l'hippocampe seraient responsables de l'expression de la potentialisation à long terme (Castillo *et al.*, 1997). Toutefois, bien que cette idée soit partagée par plusieurs chercheurs, elle ne fait pas l'unanimité



puisque l'expression de la PLT dans cette région serait inhibé par un antagoniste des RAMPA (Castillo *et al.*, 1994). Par conséquent, ceci suggère que la PLT observée au niveau des fibres moussues soit associée à l'activation des RAMPA plutôt qu'à celle des RKA. Dans le même ordre d'idée, des récepteurs kainates postsynaptiques ont aussi été localisés au niveau des interneurons de la région CA1, plus précisément dans la couche radiatum et oriens, mais leur rôle dans la transmission synaptique demeure nébuleux.

Contrairement aux RAMPA, les RKA sont aussi localisés au niveau du terminal présynaptique dans la région CA3 et CA1 où ils joueraient un rôle dans l'épilepsie (Represa *et al.*, 1987) et dans la relâche du neurotransmetteur glutamate (Chittajallu *et al.*, 1996).

### **Les récepteurs ionotropes de type NMDA**

Contrairement aux RAMPA et aux RKA, les récepteurs NMDA sont définis comme étant des récepteurs voltages et ligands-dépendants, c'est-à-dire que l'ouverture du canal ionique nécessite à la fois la liaison du neurotransmetteur glutamate et la dépolarisation de l'élément postsynaptique. Lorsque ces deux conditions sont remplies, l'ion magnésium présent à l'intérieur canal est expulsé et il y a passage des ions  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$  et  $\text{Ca}^{2+}$ . Ainsi, l'activation des RNMDA nécessite : A) la liaison du glutamate, B) la liaison de la glycine, qui joue le rôle de coagoniste et C) la dépolarisation de l'élément postsynaptique. En plus des sites de liaison pour le glutamate et la glycine, le RNMDA possède un site de liaison pour les polyamines, un site pour le

zinc et finalement, des sites modulateurs présents à l'intérieur du canal (Ozawa *et al.*, 1998).

Bien qu'ils soient présents dans l'ensemble des régions cérébrales, les RNMDA prédominent dans la région CA1 de l'hippocampe. Localisés au niveau postsynaptique, ces récepteurs hétéromériques sont composés d'un assortiment de trois types de sous-unités dont NR1, NR2 et NR3. D'ailleurs, il a été démontré que la sous-unité NR1 doit absolument s'associer avec une ou plusieurs sous-unités NR2 pour former un récepteur fonctionnel, et que l'association NR1-NR2A générerait un influx calcique cinq fois plus important que n'importe laquelle des associations (Grant *et al.*, 1997).

Du point de vue physiologique, les RNMDA jouent un rôle primordial dans l'induction de la potentialisation et de la dépression à long terme. Puisqu'une section complète sera consacrée à ces deux phénomènes, l'aspect fonctionnel des RNMDA sera détaillé ultérieurement.

## **Les récepteurs glutamatergiques de type métabotrope**

Jusqu'au milieu des années 80, la communauté scientifique croyait que les effets du glutamate étaient liés uniquement à l'activation des récepteurs ionotropes de type AMPA, kaïnate et NMDA. Toutefois, il a été démontré que ce neurotransmetteur pouvait aussi moduler la production de messagers cellulaires dans différentes régions cérébrales. Dès lors, un nouveau type de récepteur possédant des caractéristiques similaires aux récepteurs couplés aux protéines G (RCPG) a été associé au

neurotransmetteur glutamate; il s'agit des récepteurs glutamatergiques de type métabotrope (mGluRs).

Les mGluRs sont de larges protéines composées d'un domaine hydrophilique en N-terminal, d'une région centrale composée de sept domaines transmembranaires et d'un domaine C-terminal intracellulaire. Contrairement aux récepteurs de type ionotrope, le site de liaison du ligand se retrouve à l'intérieur de deux lobules globulaires qui, une fois le neurotransmetteur lié, vont changer de conformation pour générer des signaux intracellulaires (Figure 3). Une fois activés, les mGluRs postsynaptiques sont responsables, via l'activation d'une protéine G présente sur la face cytosolique, de l'inhibition des courants potassiques et de l'activation des canaux cationiques non sélectifs comme les échangeurs  $\text{Na}^+/\text{Ca}^+$  et les canaux calciques (Anwyl 1999). En ce qui concerne les mGluRs présynaptiques, ils sont considérés comme étant des autorécepteurs, c'est-à-dire que leur stimulation va inhiber, toujours via l'activation d'une protéine G, la relâche du neurotransmetteur glutamate dans la fente synaptique. Cet effet est lié à l'inhibition des canaux calciques, à l'activation des canaux potassiques présynaptiques et à l'inhibition des protéines impliquées dans la relâche des vésicules de neurotransmetteurs (Conn and Pin 1997; Dale *et al.*, 2002).

Du point de vue moléculaire, huit gènes différents codent pour les huit sous-types de mGluRs (mGlu1-8), lesquels sont répartis dans trois grands groupes selon leur profil pharmacologique, leur homologie de structure et leurs signaux de transduction (Tableau II; p.25) (Conn and Pin 1997; Anwyl 1999; Dale *et al.*, 2002). Étant donné la diversité des récepteurs métabotropes, plusieurs composés sont synthétisés dans le but de caractériser et de différencier les différents groupes de récepteur. Dans

le cas des récepteurs appartenant au groupe I, le premier agoniste identifié après le glutamate a été le quisqualate. Toutefois, malgré sa force et sa sélectivité pour mGluR1 et mGluR5, son utilisation a été limitée par le fait qu'il se liait aussi aux récepteurs ionotropes de type AMPA. Dans le même ordre d'idée, le 1S,3R-ACPD, considéré lors de son développement comme étant un agoniste du récepteur mGluR1, s'est avéré efficace au niveau de tous les mGluRs. Par conséquent, puisque chaque groupe de récepteurs possède des caractéristiques spécifiques, les principales molécules agonistes et antagonistes ont été regroupées dans le tableau II.

Groupe	Récepteurs	Signaux Intracellulaires	Agonistes	Antagonistes
Groupe I	mGluR 1a-e	Activation G <sub>q</sub>	(S)-3,5-DHPG	CPCCOEt (Non Compéti- tif/mGlu1)
	mGluR 5a-b		3-HPG t-ADA	MPEP (Non Compéti- tif/mGlu5)
Groupe II	mGluR 2	Activation G <sub>i</sub>	LY 379268	EGLU
	mGluR 3		LY 354740 2R,4R-APDC	LY 341495 LY 307452
Groupe III	mGluR 4a-b	Activation G <sub>i</sub>	L-AP4	CPPG
	mGluR 6 mGluR 7a-b mGluR 8a-b		L-SOS S-glutamate	MAP4

**Tableau II. Propriétés moléculaires et pharmacologiques des récepteurs métabotropes (Conn and Pin 1997; Michaelis 1998; Dingledine *et al.*, 1999).**

Tout comme les récepteurs glutamatergiques de type ionotrope, les synapses glutamatergiques exprimant les mGluRs sont impliquées dans les phénomènes de potentialisation et de dépression à long terme. Concernant la PLT, il a été démontré qu'elle pouvait être induite suite à l'application d'un agoniste non sélectif des mGluRs, l'ACPD, dans la région CA1 de l'hippocampe, dans le gyrus dentelé et dans les cellules granulaires du cervelet. Toutefois, bien que la liaison de l'agoniste soit nécessaire, elle n'est pas suffisante puisque l'induction de la PLT nécessite aussi la dépolarisation de l'élément postsynaptique.

Dans le cas de la DLT, elle serait dépendante de l'activation des mGluRs dans la région CA1 de l'hippocampe, dans le gyrus dentelé, dans le néocortex et dans le cervelet, mais aussi indépendante de ces récepteurs dans le CA1 et le néocortex (Anwyl 1999).

En plus de leur rôle au niveau des synapses glutamatergiques, des études conduites sur les mGluR4, 6, 7 et 8 ont démontré que leur activation déprime la transmission GABAergique entre les interneurons ce qui a comme conséquence d'augmenter la relâche du neurotransmetteur GABA sur les neurones pyramidaux. De cette façon, l'activation des récepteurs de type métabotrope préviendrait les conditions pathologiques associées à l'hyper ou l'hypoexcitabilité (Conn and Pin 1997; Dale *et al.*, 2002).

### ***Contribution des récepteurs glutamatergiques au phénomène d'excitotoxicité***

Tel que mentionné dans la section sur le glutamate, la présence prolongée ou la libération excessive de ce neurotransmetteur dans la fente synaptique peut être

toxique pour les neurones. Ce phénomène nommé excitotoxicité est souvent associé aux récepteurs glutamatergiques de type RNMDA puisque leur principale caractéristique est d'être perméable aux ions calcium qui sont neurotoxiques lorsqu'il sont présents en trop grande quantité (Sattler and Tymianski 2000). Brièvement, l'activation excessive du RNMDA va augmenter la production de radicaux libres dérivés de l'oxygène, suractiver les enzymes calcium-dépendantes et induire des dommages au niveau de l'ADN. À titre d'exemple, l'épilepsie et la maladie d'Huntington sont deux conditions pathologiques où la mort neuronale peut être corrélée au phénomène d'excitotoxicité. Dans le but de prévenir les conséquences d'une suractivation des RNMDA, plusieurs antagonistes glutamatergiques sont considérés comme étant neuroprotecteurs et ils sont utilisés, ou en voie de l'être, comme agents thérapeutiques dans certaines pathologies dont la maladie de Parkinson et l'épilepsie (Palmer 2001).

Initialement, les RNMDA étaient perçus comme étant les seuls responsables du phénomène d'excitotoxicité. Toutefois, il a été démontré que l'activation de plusieurs autres récepteurs, dont les RAMPa perméables au calcium, les RKA et les récepteurs métabotropes, pouvait aussi mener à la mort neuronale. Concernant les RAMPa, la neurotoxicité induite par leur suractivation entraîne une augmentation rapide du sodium intracellulaire de même qu'une entrée importante d'eau à l'intérieur de la cellule. Cet événement nommé choc osmotique va se terminer par la rupture de la membrane cellulaire et par la mort du neurone (Yoshioka *et al.*, 1995; Zeevalk *et al.*, 1995). Du point de vue clinique, des antagonistes spécifiques aux RAMPa ont démontré leur efficacité dans la prévention des dommages induits lors de l'ischémie cérébrale (Yatsugi *et al.*, 1996).

Dans le cas des RKA, leur stimulation par la molécule de kaïnate génère chez l'animal des dommages cérébraux similaires à ceux présents chez les patients épileptiques. D'ailleurs, il a été démontré que des lésions sélectives dans la région des fibres moussues diminuent les convulsions induites par le kaïnate, ce qui renforce l'idée voulant que les RKA présents dans la région CA3 de l'hippocampe soient impliqués dans le déclenchement des crises d'épilepsie (Gaiarsa *et al.*, 1994).

Tout comme les récepteurs sensibles au kaïnate, les mGluRs jouent un rôle important dans l'épilepsie en prolongeant la dépolarisation de l'élément postsynaptique débutée par l'activation des récepteurs glutamatergiques de type ionotrope. Dans le compartiment intracellulaire, cette activation mène à la mobilisation du calcium, à l'activation des mécanismes calcium-dépendants et à l'induction de la mort neuronale (Attucci *et al.*, 2002). Toutefois, seulement l'activation des mGluRs du groupe I provoque des décharges neuronales caractéristiques de l'épilepsie puisque l'activation des mGluRs du groupe II et III auraient un rôle anticonvulsivant (Wong *et al.*, 1999).

Pour terminer, il est important de mentionner que le stress oxydatif et la déplétion intracellulaire du glutathion sont aussi des composantes associées à la mort neuronale induite par le glutamate. Dans le cas du glutathion, l'excitotoxicité débalance le processus de synthèse de cet antioxydant naturel et diminue sa concentration à l'intérieur des neurones. Normalement, le glutamate et la cystéine utilisent un transporteur commun qui les amène respectivement à l'extérieur et à l'intérieur de la cellule. Lors du phénomène d'excitotoxicité, l'augmentation extracellulaire de glutamate réduit l'entrée de cystéine au niveau cellulaire et, puisque cet acide aminé est un précurseur du glutathion, sa synthèse sera diminuée. Par conséquent, les neurones

affectés seront plus vulnérables aux radicaux libres générés lors du stress oxydatif (Heath and Shaw 2002).



## La potentialisation à long terme (PLT)

Les informations présentées dans la section précédente ont démontré que le système glutamatergique est composé d'un nombre impressionnant de récepteurs et que tous et chacun jouent un rôle important dans la transmission synaptique. Tel qu'il a été mentionné à plusieurs reprises, l'une des principales fonctions associées au système glutamatergique est l'induction et l'expression de la PLT. Dans cette section, il sera question des mécanismes physiologiques et cellulaires sous-jacents à ce modèle électrophysiologique.

### *Mécanisme d'induction de la PLT*

La PLT est un modèle expérimental définit comme étant une augmentation à long terme de la transmission synaptique suite à une stimulation de haute fréquence (SHF = 10 trains de hautes fréquences composés chacun de quatre pulsations de 100Hz et appliqués à un intervalle de 5Hz). Développé par Larson et ses collaborateurs en 1986, ce patron de stimulation électrique est nommé stimulation tétanique et fait référence au rythme thêta observé dans la région hippocampale de rat lors d'une séance d'apprentissage. Au niveau de l'hippocampe, deux formes de PLT peuvent être induites par cette stimulation de haute fréquence; il y a la forme NMDA-dépendante qui nécessite l'activation des récepteurs ionotropes de type NMDA et la forme NMDA-indépendante qui requière l'activation des canaux calciques voltages-dépendants. Bien que ces deux formes de potentialisation se produisent dans la région CA1 de l'hippocampe, la forme indépendante des RNMDA serait davantage présente au niveau du cervelet. Dans les prochaines sections, il sera principalement

question de la forme NMDA-dépendante puisque plusieurs études ont démontré l'importance de cette forme de potentialisation dans les phénomènes d'apprentissage et de mémorisation (Malenka and Nicoll 1999).

Sur le plan expérimental, l'induction de la PLT peut se faire à trois endroits différents dans l'hippocampe. Dans un premier temps, la stimulation des neurones de la voie perforante permet l'enregistrement de la PLT au niveau des cellules granulaires du gyrus dentelé, alors que la stimulation des fibres moussues va induire le phénomène au niveau des neurones de la région CA3. Finalement, la stimulation des collatérales de Schaffer se traduit par l'induction de la PLT au niveau des cellules pyramidales de la région CA1 (Figure 1).

Afin de bien comprendre les mécanismes sous-jacents à l'induction de la PLT, vous trouverez à la figure 5 une représentation schématique du phénomène incluant le neurotransmetteur glutamate et les récepteurs ionotropes de type AMPA et NMDA. Durant une stimulation de basse fréquence, le glutamate libéré par l'élément présynaptique se lie à la fois aux récepteurs AMPA et NMDA présents au niveau postsynaptique. En ce qui a trait aux AMPA, la liaison du neurotransmetteur suffit à l'ouverture du canal ionique et au passage des ions  $\text{Na}^+$  et  $\text{K}^+$ . Toutefois, dans le cas des RNMDA ligands et voltages-dépendants, la liaison du glutamate est insuffisante donc le récepteur est imperméable aux ions et ce jusqu'à ce qu'il y ait dépolarisation de la membrane postsynaptique. Lorsque le seuil de dépolarisation est atteint, l'ion magnésium présent à l'intérieur du canal est expulsé et les ions  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$  et  $\text{Ca}^{2+}$  traversent le RNMDA (Figure 5). Sur le plan fonctionnel, cet influx calcique généré

suite à l'ouverture des RNMDA est considéré comme étant l'élément déclencheur du phénomène d'induction de la PLT.

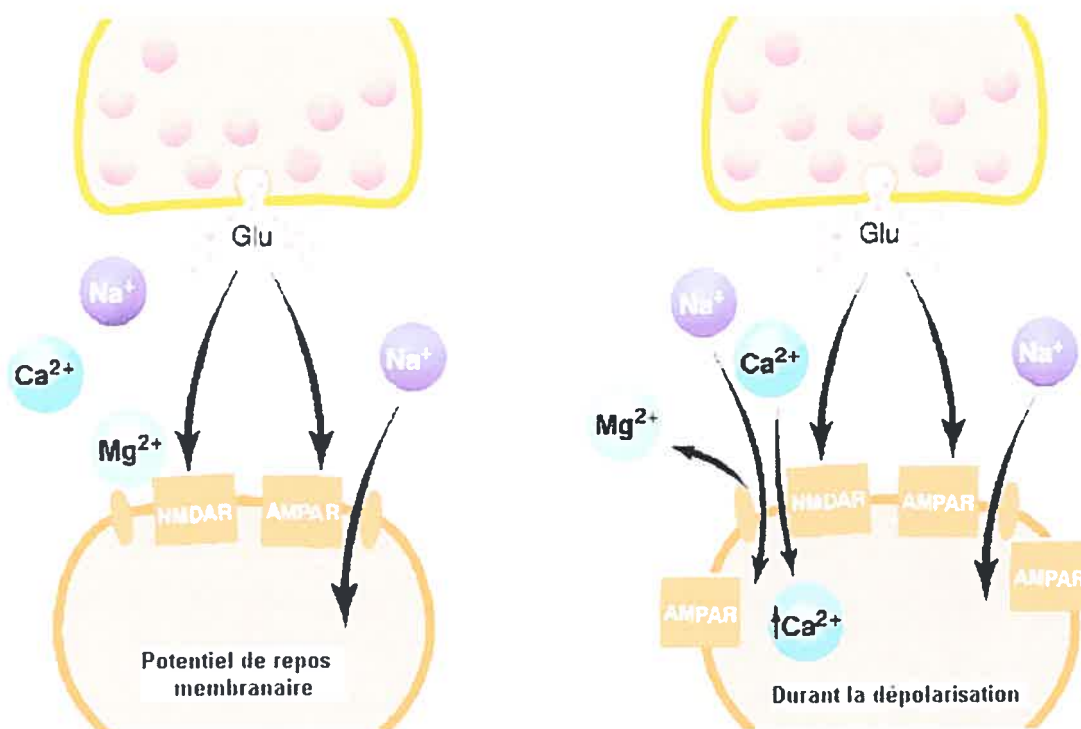


Figure 5. Représentation schématique du phénomène d'induction de la PLT

### ***Mécanisme d'expression et de maintien de la PLT***

Bien que les étapes d'induction de la PLT soient relativement bien connues, celles responsables du maintien et de l'expression du phénomène sont moins bien définies. D'ailleurs, même si les scientifiques s'entendent sur le fait que l'entrée de calcium au niveau postsynaptique constitue l'étape clé de l'induction du phénomène, deux théories relatives à l'expression de la PLT sont encore débattues de nos jours.

Tout d'abord, la première hypothèse dite présynaptique propose que l'expression de la PLT dans la région CA1 et CA3 de l'hippocampe soit le résultat

d'une augmentation de la relâche de glutamate par l'élément présynaptique (Bliss and Collingridge 1993). Plus précisément, il est suggéré que cette libération accrue de neurotransmetteur soit causée par l'action d'un messenger chimique synthétisé par le neurone postsynaptique. À ce jour, l'acide arachidonique (AA), l'oxyde nitrique (NO) et le monoxyde de carbone (CO) sont les trois molécules diffusibles suspectées de jouer un rôle déterminant dans cette hypothèse présynaptique (Bohme *et al.*, 1991; Lynch *et al.*, 1991; Zhuo *et al.*, 1993). Sur le plan expérimental, l'AA a été la première substance endogène proposée comme messenger rétrograde puisque l'expression de la PLT impliquent l'activation de la PLA<sub>2</sub> responsable de sa synthèse (Lynch *et al.*, 1989). Cette proposition a par la suite été confirmée par le fait qu'un inhibiteur de la PLA<sub>2</sub> prévenait l'expression de la PLT (Massicotte *et al.*, 1990) et que l'ajout exogène d'AA favorisait l'apparition de la PLT dans la région CA1 (Williams *et al.*, 1989). Outre l'AA, l'inhibition de la synthèse du NO préviendrait l'induction de la PLT et quant au CO, l'équipe du Dr Kandel a rapporté qu'il serait à même de réguler la PLT hippocampique en augmentant l'activité présynaptique (Zhuo *et al.*, 1993).

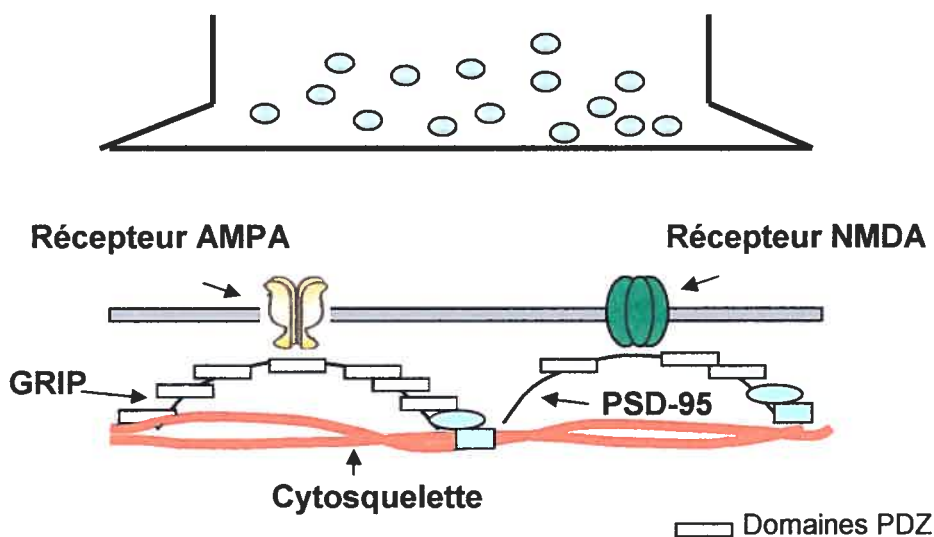
Bien que les études visant à démontrer le rôle des messagers rétrogrades dans l'hypothèse présynaptique se soient avérées concluantes, il en est autrement pour celles dirigées vers l'élément présynaptique. Tout d'abord, il a été rapporté qu'une double stimulation de l'élément présynaptique n'affectait pas l'expression de la PLT dans la région CA1 de l'hippocampe (Muller and Lynch 1989). Puisque ce type de stimulation (« paire pulse stimulation ») permet de vérifier l'état des paramètres impliqués dans la relâche des neurotransmetteurs, ces observations suggèrent que l'élément présynaptique ne joue pas un rôle cruciale dans l'expression de la PLT au niveau de

CA1. De plus, certains se sont attardés à l'ampleur de la réponse synaptique générée par chacune des vésicules de neurotransmetteur libérées (ou quanta) par l'élément présynaptique. Malgré le travail laborieux que suggère ce type d'analyse quantique, les résultats obtenus se sont avérés contradictoires (Malenka 1994).

Concernant la deuxième hypothèse dite postsynaptique, elle suggère que la PLT résulte de l'activation de synapses insensibles au neurotransmetteur glutamate (synapses silencieuses) (Kauer *et al.*, 1988). Au niveau cellulaire, cette transition des synapses silencieuses aux synapses actives s'expliquerait par l'activation des enzymes calcium-dépendantes conséquemment à l'activation des RNMDA, de même que par l'insertion de nouveaux RAMPA au niveau de la synapse. Tel qu'il sera discuté dans les prochaines sections, l'activation de ces enzymes va modifier les propriétés fonctionnelles et biochimiques des récepteurs AMPA et NMDA membranaires de manière à favoriser l'expression de la PLT. De plus, dans le cas où les récepteurs ne seraient pas présents au niveau de la synapse, l'expression de la PLT proviendrait de l'insertion de nouveaux récepteurs AMPA présents dans le compartiment cytosoliques.

## Régulation des récepteurs glutamatergiques lors de l'expression de la PLT

Les récepteurs AMPA et NMDA impliqués dans le phénomène de la PLT sont ancrés dans une structure microscopique nommée densité postsynaptique (PSD, de l'anglais « postsynaptic density ») où ils sont régulés par différentes enzymes comme les kinases, les lipases et les protéases (Figure 6). Cet environnement dynamique dans lequel gravitent les récepteurs ionotropes est composé d'une multitude de protéines qui influencent les caractéristiques fonctionnelles et structurales de ces récepteurs de même que leurs fonctions au niveau de l'élément postsynaptique.



**Figure 6 : Représentation schématique de la densité postsynaptique**

Une fois insérés dans la densité postsynaptique, les AMPA interagissent avec un nombre impressionnant de protéines d'ancrage qui ont pour fonction d'améliorer leur stabilité et leur insertion au sein de la membrane synaptique (Ta-

bleau III; p.38). La première protéine découverte comme étant associée aux RAMPA porte le nom de GRIP, en référence au nom anglais « Glutamate receptor interacting protein ». Elle contient sept domaines PDZ qui sont en fait des séquences d'acides aminés responsable de l'interaction entre les protéines d'ancrage et les sous-unités des récepteurs ou encore entre les protéines d'ancrage et le cytosquelette (Figure 6) (Xia *et al.*, 1999). Par la suite, d'autres protéines de liaison dont Pick1 (« Protein interacting with C kinase ») et GRIP2 (ou ABP « AMPA receptor binding protein ») ont été découvertes comme étant associées aux récepteurs AMPA composés des sous-unités GluR2, GluR3 et GluR4c. Toutefois, bien que GRIP1 et Pick1 interagissent toutes les deux avec la sous-unité GluR2, il a été démontré que GRIP1 serait la seule des deux protéines à être responsable de l'insertion des sous-unités dans la membrane synaptique (Osten *et al.*, 2000). De plus, puisque la surexpression de Pick1 dans les neurones diminue l'expression de la sous-unité GluR2, ceci suggère que cette protéine soit davantage impliquée dans l'internalisation des RAMPA (Perez *et al.*, 2001).

Parallèlement, les protéines NSF, SAP97, 4.1N et NARP sont aussi impliquées dans la stabilisation et l'insertion des RAMPA au niveau de la membrane synaptique. Tout d'abord, la protéine NSF, responsable des mécanismes de fusion membranaire, interagirait avec la sous-unité GluR2 des RAMPA puisqu'une mutation au niveau de cette sous-unité préviendrait son interaction avec NSF et diminuerait la transmission synaptique médiée par les RAMPA (Song *et al.*, 1998). Concernant SAP97, son interaction avec la sous-unité GluR1 permettrait l'insertion des RAMPA dans la synapse lors de la PLT alors que la liaison avec la protéine 4.1N serait davantage impliquée dans la stabilisation du récepteur dans la membrane (Leonard *et al.*,

1998; Shen *et al.*, 2000). Finalement, la protéine NARP (« Neuronal activity regulated pentraxin ») a été découverte suite à l'induction de la PLT dépendante des RNMDA et son expression permettrait le rassemblement des récepteurs AMPA dans la synapse.

Contrairement aux protéines cellulaires énumérées précédemment, une protéine transmembranaire nommée Stargazine a récemment été découverte dans l'environnement immédiat des récepteurs AMPA et NMDA. En plus d'interagir avec les quatre sous-unités composant les RAMPs, cette dernière serait aussi liée au domaine PDZ de la molécule PSD-95 qui est associée aux RNMDA. Bien qu'elle soit principalement impliquée dans l'insertion des récepteurs AMPA, le lien qu'elle partage avec PSD95 serait nécessaire à la localisation des récepteurs NMDA dans la densité postsynaptique (Shen *et al.*, 2000).

Concernant les RNMDA, ils sont aussi associés, via leur domaine C-terminal, à différentes protéines d'ancrage qui permettent, tout comme pour les RAMPs, la stabilisation et l'insertion du récepteur au niveau de la membrane. Par exemple, l'interaction des sous-unités NR1 et NR2B avec l' $\alpha$ -Actinine permet l'insertion du récepteur NMDA au niveau de la synapse alors que son association avec les MAGUKs facilite l'ancrage des récepteurs (Wyszynski *et al.*, 1997; Allison *et al.*, 1998; Song and Huganir 2002). Compte tenu de la diversité des protéines impliquées dans la régulation des RNMDA, chacune de ces molécules est présentée en détail dans le tableau III.



Types de récepteur	Protéines associées aux récepteurs	Nbre de domaine PDZ	Site d'interaction	Rôle principal
AMPA	GRIP1	7	GluR2:GluR3;GluR4c	Localisation des RAMPA
	GRIP2 (ou ABP)			
	PICK	2	GluR2:GluR3;GluR4c	Internalisation des RAMPA
	NSF	-	GluR2	Mouvement des vésicules synaptiques
	SAP97	3	GluR1	Insertion des RAMPA
	4.1N	-	GluR1	Stabilisation des RAMPA
	Stargazine	-	GluR1-4; PSD-95	Insertion des RAMPA
Kainate	NARP	-	GluR1-4	Rassemblage des RAMPA
	PSD-95/SAP90	3	GluR6: KA2	Prévient la désensibilisation du RKA
	SAP97 SAP102	3	Non déterminé	Non déterminé
NMDA	PSD-95*			
	SAP102*	3	NR1:NR2	Ancre des RNMDA dans la membrane
	SAP97*			
	PSD-93*			
	AP-2	-	NR1	Endocytose
	Actine	-	NR1:NR2B	Insertion des RNMDA
	Neurofilament-L	-	NR1	Non déterminé
	Spectrine	-	NR1:NR2A	Non déterminé
	Calmoduline	-	NR1	Inactivation des RNMDA
	Yotiao	-	NR1	Non déterminé
	CAMKII	-	NR1:NR2A-B	Régulation des RAMPA
	PLC	-	NR2B	Régulation des RAMPA
	c-Src	-	NR2B	Augmente l'activité des RNMDA

\* Ces protéines sont regroupées sous le terme MAGUKs ("Membrane Associated Guanylate Kinase")

Tableau III. Caractéristiques structurales et fonctionnelles des protéines associées aux récepteurs glutamatergiques de type ionotrope (Dingledine et al., 1999; Song and Huganir 2002; Wenthold et al. 2003).

## Les protéines kinases et les phosphatases

Une fois que les récepteurs AMPA et NMDA sont bien ancrés dans la densité postsynaptique, leurs caractéristiques biochimiques et fonctionnelles sont modifiées par l'action des différentes protéines kinases et phosphatases (Tableau IV; p40) (Swope *et al.*, 1999; Soderling and Derkach 2000). Par exemple, la phosphorylation de la sous-unité GluR1 par la protéine kinase dépendante du complexe  $\text{Ca}^{2+}$ /calmoduline (CAMKII) augmente la conductance de même que l'insertion des RAMPA au niveau de la synapse (Song and Huganir 2002). Aussi, la phosphorylation de la sérine 845 par la protéine kinase A (PKA) et de la sérine 831 par la protéine kinase C (PKC) jouerait un rôle important dans les modifications associées à l'expression de la PLT et à la DLT (Bi *et al.*, 1998; Banke *et al.*, 2000). En plus des sites de phosphorylation présents sur la sous-unité GluR1, il a été démontré que les sérines 863 et 880 retrouvées sur le domaine C terminal de la sous-unité GluR2 étaient aussi phosphorylées *in vivo* et *in vitro* par la PKC (McDonald *et al.*, 2001). D'ailleurs, la sérine 880 interagirait avec différentes protéines possédant des domaines PDZ dont PSD95, Dlg et ZO1 (Matsuda *et al.*, 1999; Chung *et al.*, 2000).

En ce qui concerne le récepteur NMDA, ses multiples fonctions sont aussi régulées par la phosphorylation des sérines, des thréonines ou des tyrosines présentes en C terminale. À titre d'exemple, le RNMDA peut être phosphorylé par la PKA, la PKC et la CAMKII, ou encore par les protéines tyrosines kinases (PTK) comme c-Src ou Fyn (Michaelis 1998). De façon générale, l'activation de ces enzymes converge toujours vers un même point, c'est-à-dire l'augmentation de la réponse médiée par les RNMDA. Plus spécifiquement, la phosphorylation par la PKC et la

tyrosine kinase c-Src augmente les probabilités d'ouverture du canal en diminuant l'affinité des RNMDA pour le magnésium alors que la phosphorylation de la sous-unité NR1 par la PKA prévient sa liaison avec la spectrine (Dingledine *et al.*, 1999). Finalement, la CAMKII, principalement reconnue pour son rôle dans la régulation des RAMPs, serait aussi associée aux RNMDA mais elle jouerait davantage un rôle structural qu'enzymatique en reliant avec la sous-unité NR2B au cytosquelette de la cellule.

Types de récepteur	Enzymes	Site d'action	Rôle principal
AMPA	PKA	Ser 845 sur GluR1;GluR2L; GluR4 et Ser 842 sur GluR4c	↑ Réponse synaptique des RAMPs
	PKC (ou PKM)	Ser 831 sur GluR1;Ser 863/Ser 880 sur GluR1;GluR2; GluR3-4c	↑ Réponse synaptique des RAMPs et la sensibilité au glutamate
	CAMKII	Ser 831 sur GluR1	Essentielle à l'expression de la PLT (↑ conductance du canal)
Kainate	PKA	GluR6 (Ser 684 pour PKA)	↑ conductance
	PKC		
	CAMKII		
NMDA	PKA	NR1;NR2A;NR2B	Localisation des RNMDA
	PKC	NR1;NR2A	↑ probabilité d'ouverture et l'exocytose des RNMDA
	CAMKII	Ser 1289 sur NR2A; Ser 1309 sur NR2B;	Non déterminé
	Famille des PTK (c-Src; Fyn; Lyn; Lck; Yes)	Ser 1232 NR2A	Potentialisation des courants ioniques et nécessaire à la PLT

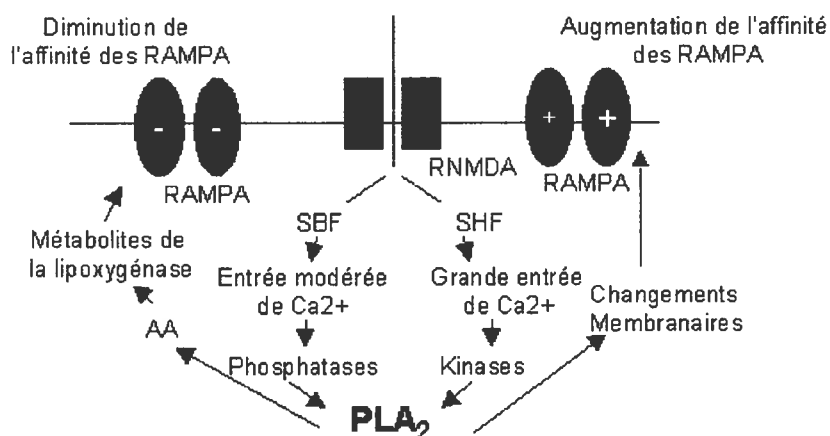
**Tableau IV : Tableau synthèse des différentes kinases impliquées dans la régulation des récepteurs glutamatergiques de type ionotrope (Dingledine *et al.*, 1999; Song and Huganir 2002; Wenthold *et al.*, 2003).**

Alors que la phosphorylation des récepteurs ionotropes par les protéines kinases augmente l'activité des récepteurs AMPA et NMDA, leur déphosphorylation par les phosphatases prévient cette augmentation et contribue au phénomène de dépression synaptique. Par exemple, la présence de la calcineurine au niveau de la densité postsynaptique favorise la désensibilisation du RNMDA en diminuant sa sensibilité aux agonistes (Coghlan *et al.*, 1995; Wang *et al.*, 1996) alors que l'inhibition de la protéine phosphatase 1 (PP1) bloque la DLT dépendante du RNMDA (Morishita *et al.*, 2001). Dans le cas des RAMPA, l'activation de la calcineurine faciliterait l'endocytose des récepteurs via son association avec le complexe dynamine/amphiphysine alors que l'inhibition de PP1 bloquerait ou activerait selon certains auteurs le processus d'endocytose (Beattie *et al.*, 2000).

## **Les phospholipases**

Plusieurs évidences expérimentales suggèrent que l'activation des phospholipases, et plus particulièrement de la phospholipase A<sub>2</sub> (PLA<sub>2</sub>), découle de l'ouverture des récepteurs NMDA. D'ailleurs, il a été démontré que l'activation de ces récepteurs lors de l'induction de la PLT augmente l'activité de la PLA<sub>2</sub> endogène, alors que l'inhibition de cette enzyme prévient l'induction de la PLT et la DLT (Massicotte 2000). Toujours sur le plan expérimental, l'utilisation de faibles concentrations de PLA<sub>2</sub> diminue la liaison de l'agoniste 3H-AMPA à son récepteur alors que de fortes concentrations semble l'augmenter (Chabot *et al.*, 1998) ce qui suggère que le degré d'activation de cette enzyme puisse à la fois influencer l'expression de la PLT et de la DLT. Cette expérience réalisée par Chabot et ses collaborateurs a d'ailleurs permis

l'élaboration d'un modèle biochimique hypothétique permettant d'expliquer le contrôle bidirectionnel des RAMPA par la PLA<sub>2</sub> (Figure7) (Chabot *et al.*, 1998).



**Figure 7 : Mécanisme hypothétique responsable de la régulation des RAMPA**  
(adaptée de Chabot *et al.*, 1998)

Brièvement, ce modèle suggère qu'une stimulation de basse fréquence (SBF), mimant la DLT, génère un influx calcique modéré qui est associé à l'activation des phosphatases puis de la PLA<sub>2</sub>. Une fois activée, la PLA<sub>2</sub> va agir au niveau des phospholipides membranaires et entraîner la formation de métabolites dérivés de l'AA qui vont diminuer l'affinité du RAMPA pour son ligand. À l'opposé, la PLT, simulée par une stimulation de haute fréquence (SHF), va augmenter l'affinité du RAMPA pour son ligand en modifiant l'environnement lipidique du récepteur. Il est à noter que dans ce cas, la stimulation de haute fréquence va entraîner un influx calcique plus important et activer préférentiellement les kinases puis la PLA<sub>2</sub>. Des études plus poussées sur l'environnement lipidique des récepteurs ont d'ailleurs démontré que l'ajout de phosphatidylsérine (PS) augmentait, tout comme l'activation de la PLA<sub>2</sub>, la liaison aux RAMPA (Gagne *et al.*, 1996).

Parallèlement à ces observations réalisées sur la PLA<sub>2</sub> calcium-dépendante, il a récemment été démontré que l'inhibition de PLA<sub>2</sub> indépendante du calcium (iPLA<sub>2</sub>) augmentait l'amplitude de la réponse médiée par les RAMPs (St-Gelais *et al.*, sous-presse). Bien que le mécanisme sous-jacent à ces observations reste à déterminer, cette enzyme constitutive régulerait aussi à la hausse les sous-unités des récepteurs AMPA, renforçant ainsi l'hypothèse que cette enzyme et/ou ses métabolites affectent la neurotransmission excitatrice dans la région CA1 de l'hippocampe (St-Gelais *et al.*, sous-presse).

## La calpaïne

La calpaïne est une protéase calcium-dépendante impliquée dans la potentialisation à long terme, dans la régulation des récepteurs glutamatergiques et dans l'hydrolyse de la spectrine. Les premières évidences expérimentales démontrant un lien entre la calpaïne et le récepteur AMPA ont été fournies par une étude d'immunobuvardage de type Western où il a été observé que l'activation *in situ* de la calpaïne menait à la coupure partielle du domaine C terminal des sous-unités GluR1 et GluR2/3 (Bi *et al.*, 1996). Par la suite, des expériences plus approfondies ont ciblé de façon précise que le site de coupure était présent au niveau des résidus 833-834/837-838 et 885-886, lesquelles menaient à la formation d'une sous-unité GluR1 de 98kDa et de 104.5kDa (Bi *et al.*, 1998). Du point de vue fonctionnel, l'impact de ces coupures reste à déterminer, malgré que certains auteurs suggèrent qu'elles altèrent le récepteur et mène à son internalisation (Bi *et al.*, 1996).

Bien que la majorité des données concernant la protéolyse des récepteurs par la calpaïne concerne les RAMPs, il a été démontré que la sous-unité NR2 des

RNMDA serait aussi sujette à la protéolyse. Du point de vue fonctionnel, cette coupure semble modifier la configuration du canal puisque la liaison du 3H-TCP est fortement diminuée alors qu'aucun changement n'est observé pour la liaison des agonistes compétitifs du récepteur (Bi *et al.*, 1998).

## ***Mouvement des récepteurs AMPA au niveau de la membrane synaptique***

De nos jours, plusieurs groupes de recherche tentent de comprendre les mécanismes qui régissent l'exocytose, l'endocytose et la stabilisation des AMPA au sein de la membrane synaptique. Dans les prochaines sections, les étapes clés de ces phénomènes seront discutées de même que l'implication de certains inositols polyphosphates dans la plasticité synaptique.

### **Endocytose des récepteurs AMPA**

L'une des premières évidences expérimentales démontrant le mouvement des récepteurs AMPA a été observée suite à l'application de glutamate sur des tranches d'hippocampe en cultures (Lissin *et al.*, 1999). Dans cette étude, une perte significative des récepteurs synaptiques a été démontrée ce qui laisse présager qu'une stimulation importante des récepteurs glutamatergiques de type ionotrope mène à leur internalisation. Par la suite, d'autres études ont démontré que la perte des AMPA membranaires était induite par la stimulation des récepteurs NMDA, des mGluRs, des récepteurs à l'insuline de même que par leur propre stimulation (Beattie *et al.*, 2000; Ehlers 2000; Man *et al.*, 2000). Dans le cas où l'endocytose est médiée par l'activation des AMPA, les récepteurs internalisés sont dirigés vers les lysosomes où ils seront éventuellement détruits. Par contre, s'ils sont internalisés suite à l'activation des NMDA, les AMPA seront réinsérés dans la membrane synaptique suite à leur recyclage dans les endosomes (Ehlers 2000).



Concernant les étapes menant à l'internalisation des récepteurs, il a récemment été démontré que l'endocytose des RAMPs est tributaire de la clathrine et des protéines qui y sont associées (Man *et al.*, 2000). Brièvement, la cascade d'événements menant à l'internalisation des récepteurs AMPA débute avec le mouvement des récepteurs synaptiques vers les dépressions membranaires tapissées, sur la paroi interne, de molécules protéiques nommées clathrine. Annexée à la membrane, la clathrine est retrouvée sous forme de triskélions, lesquels, une fois assemblés, vont former un réseau hexagonal de clathrine contenant les récepteurs endocytés. Bien que cette protéine cytosolique soit essentielle à l'endocytose, sa présence n'est pas suffisante; en ce sens, il a été démontré que des protéines adaptines (AP) assurent le lien entre le récepteur et la clathrine. Par exemple, dans le cas des récepteurs glutamatergiques de type AMPA, la technique de coimmunoprécipitation a révélé que la sous-unité GluR2 de ces récepteurs interagit avec la protéine adaptine-2 (AP-2), renforçant ainsi l'idée que ce récepteur soit endocyté via un mécanisme dépendant de la clathrine (Man *et al.*, 2000; Lee *et al.*, 2002).

Puisque l'AP-2 semble bel et bien impliquée dans l'endocytose des RAMPs, les molécules interagissant avec l'AP-2 pourraient altérer ce processus d'internalisation. À cet effet, il a été démontré que l'inositol hexakisphosphate (InsP6) possède un site de liaison sur les adaptines l'AP-2 et l'AP-3 (Timmerman *et al.*, 1992; Voglmaier *et al.*, 1992), ce qui laisse présager que les inositols phosphates présents dans le compartiment intracellulaire puissent affecter l'endocytose des récepteurs AMPA.

## Insertion des récepteurs AMPA

Les premières évidences expérimentales concernant l'insertion des AMPA dans la synapse émanent d'études électrophysiologiques réalisées dans la région CA1 de l'hippocampe. Tout d'abord, il a été suggéré que certaines synapses étaient uniquement composées de récepteurs glutamatergiques de type NMDA puisque aucune activité provenant des récepteurs AMPA n'était détectée lors du repos membranaire. Par contre, suivant l'activation des RNMDA, une réponse associée aux AMPA a été enregistrée ce qui soulève l'hypothèse que ces récepteurs soient rapidement recrutés et insérés au niveau de la synapse lors de la dépolarisation de l'élément postsynaptique. Suivant ces observations, il a été suggéré que l'induction de la PLT soit tributaire de l'insertion de nouveaux récepteurs de type AMPA au sein des synapses qui, a priori, ne contenaient que des RNMDA (Liao *et al.*, 1995). Des études plus approfondies sur ce phénomène affectant les AMPA ont permis de distinguer deux types d'insertion : l'insertion constitutive ou régulée. Tout d'abord, la combinaison des techniques d'électrophysiologie et d'imagerie ont démontré que les récepteurs AMPA composés des sous-unités GluR2-GluR3 sont remplacés, de façon constitutive par d'autres récepteurs identiques et ce, sans qu'il y ait une grande activité afférente (Sheng and Kim 2002). Toutefois, dans le cas des récepteurs GluR1-GluR2, leur présence au sein des membranes nécessite une stimulation de haute fréquence ou encore l'activation de la CAMKII impliquée dans l'expression de la PLT. De plus, les récepteurs composés des sous-unités GluR1-GluR2 sont tout d'abord insérés à l'extérieur des synapses avant de subir une translocation latérale pour être inclus au niveau synaptique (Sheng and Kim 2002). En conclusion, l'insertion des récepteurs

GluR2-GluR3 serait rapide, localisée au niveau de la synapse et indépendant de l'activité des RNMDA, alors que celle des récepteurs GluR1-GluR2 serait lente, extrasynaptique et accélérée par l'activation des RNMDA.

## **La potentialisation à long terme des systèmes inhibiteurs**

Bien que la majorité des études concernant la PLT se concentrent sur les cellules pyramidales, il est important de se souvenir que l'hippocampe est aussi composé d'interneurones qui ont comme fonction de contrôler la synchronisation et l'excitabilité des cellules environnantes. Vu l'importance de ces cellules dans le contrôle de l'activité neuronale, certains groupes de recherche se sont intéressés à la possibilité que la transmission synaptique entre ces cellules puisse être potentialisée ou déprimée (PLT ou DLT des interneurones) (Maccaferri and McBain 1996; McMahon and Kauer 1997). Par exemple, il a été démontré que les potentiels postsynaptiques excitateurs (PPSEs) étaient augmentés entre les cellules pyramidales de la région CA1 et les interneurones, alors qu'ils étaient diminués entre les cellules pyramidales de la région CA1 et les cellules baskets (McBain *et al.*, 1999). Toutefois, malgré ces quelques résultats, la complexité du réseau d'interneurones de même que la diversité de ces cellules au sein de l'hippocampe rendaient l'étude et l'isolement des phénomènes de PLT et de DLT difficiles. De plus, l'absence de la CAMKII et de la calcineurine chez ces cellules inhibitrices renforce l'hypothèse qu'elles soient incapables de produire la PLT et la DLT (McBain *et al.*, 1999).

Malgré ces obstacles, il a récemment été démontré que l'induction de la PLT des interneurones était possible si la dépolarisation de l'élément postsynaptique était

couplée à l'activation de l'élément présynaptique par une stimulation tétanique (McMahon and Kauer 1997; Christie *et al.*, 2000; Perez *et al.*, 2001). Plus précisément, ce phénomène serait tributaire des mGluR de type 1a et localisé au niveau de la couche oriens de l'hippocampe (Perez *et al.*, 2001). Dans le même ordre d'idée, l'induction de la PLT des interneurones a aussi été rapportée dans la couche radiatum où elle serait dépendante des RNMDA (Christie *et al.*, 2000) et entre les cellules granulaires et les cellules baskets du gyrus dentelé (Alle *et al.*, 2001).

En ce qui a trait à la DLT des interneurones, l'induction de la PLT dans la région CA3 de l'hippocampe se traduit par la dépression de la transmission synaptique au niveau des interneurones (Laezza *et al.*, 1999). Du point de vue cellulaire, cette forme de DLT indépendante des RNMDA serait associée à l'activation conjointe des RAMPA postsynaptiques perméables au calcium et du récepteur mGluR7 présynaptique appartenant aux mGluR du groupe III.

## La dépression à long terme

Tel que mentionné précédemment, la PLT n'est pas l'unique forme de potentialisation retrouvée à l'échelle du SNC; nous retrouvons aussi la dépression à long terme (DLT). Présente principalement au niveau du cervelet et de l'hippocampe, la DLT est un phénomène électrophysiologique qui permet l'affaiblissement des synapses de manière à ce qu'elles puissent être renforcées de nouveau et contribuer au stockage des nouvelles informations. Malgré un but commun, la DLT de l'hippocampe et celle du cervelet dépendent de mécanismes biochimiques et synapti-

ques bien différents et c'est pour cette raison que les deux formes seront traitées séparément à l'intérieur de cette section.

### ***La DLT de l'hippocampe***

La DLT de l'hippocampe est induite au niveau des collatérales de Schaffer suite à une stimulation de basse fréquence. Au niveau cellulaire, ce phénomène électrophysiologique se traduit par l'ouverture des RNMDA postsynaptiques, l'entrée modérée de calcium et l'activation du complexe calcium-calmoduline. Une fois actif, ce complexe va agir sur la phosphatase calcineurine (PP2B), entraîner l'activation des protéines phosphatases 1 et 2 (PP1/2) et mener à la déphosphorylation des RANPA. Bien que cette série d'événements soit la plus connue, il est important de mentionner que l'inactivation de la CAMKII et l'activation de la PLA<sub>2</sub> vont aussi faciliter l'induction de la DLT au niveau des cellules pyramidales de la région CA1 (Kemp and Bashir 2001).

Dans le même ordre d'idée, la DLT peut aussi être induite suite à l'activation des mGluRs du groupe I et II. D'ailleurs, l'utilisation du MCPG, un antagoniste de ces deux groupes de récepteur, préviendrait l'induction *in vivo* de la DLT dans la région CA1 de l'hippocampe (Bashir and Collingridge 1994). Du point de vue cellulaire, la contribution des mGluRs se ferait via l'inhibition de l'adénylate cyclase et via l'activation de la PLC, de la guanylyl cyclase et de la PLA<sub>2</sub>. Puisque ces enzymes sont liées à la PKC, à la PKA, à la relâche du calcium intracellulaire et à la production d'AA et de NO, ceci suggère que l'ensemble de ces mécanismes enzymatiques

associés de l'activation des mGluRs soient impliqués dans l'induction de la DLT au niveau de l'hippocampe.

### ***La DLT du cervelet***

Au niveau du cervelet, l'induction de la DLT nécessite la stimulation simultanée des cellules de Purkinje par deux types d'afférence excitatrice : les fibres grimpantes et les fibres parallèles. Premièrement, la fibre grimpante qui a comme particularité de s'enrouler autour de la cellule de Purkinje et de former plusieurs contacts excitateurs, libère une grande quantité de glutamate et active les récepteurs AMPA et métabotropes. Vu les propriétés biochimiques de chacun de ces récepteurs, l'activation des RAMPA provoque la dépolarisation de la membrane synaptique alors que celle des mGluRs de type 1 déclenche la production de seconds messagers cellulaires. Deuxièmement, l'influx nerveux provenant des fibres parallèles génère, toujours au niveau des cellules de Purkinje, une augmentation importante du calcium intracellulaire. Dans le cas où ces deux types de fibres seraient stimulés en même temps, l'influx provenant des fibres parallèles sera diminué alors que celui qui émane des fibres grimpantes sera conservé. Du point de vue fonctionnel, ceci démontre que la transmission synaptique entre les cellules de Purkinje et les fibres parallèles est déprimée, d'où l'induction de la DLT du cervelet. Bien que ce phénomène soit plus ou moins bien compris, il est suggéré que l'augmentation du calcium à l'intérieur des cellules de Purkinje active la PKC et que cette dernière diminue la réponse synaptique des RAMPA face à la stimulation provenant des fibres parallèles. Par conséquent, contrairement à la DLT de l'hippocampe, la DLT du cervelet nécessite l'activation

d'une kinase plutôt que d'une phosphatase, et l'augmentation du calcium à l'intérieur des cellules de Purkinje n'est pas tributaire de l'activation des RNMDA mais bien des canaux calciques voltages-dépendants.

## **Apolipoprotéine E, diabète et mémoire**

Depuis le début de cet ouvrage, les caractéristiques du système glutamatergique et les propriétés du phénomène de potentialisation à long terme ont été présentées dans un contexte non pathologique. Toutefois, des études réalisées autant chez l'homme que chez l'animal ont démontré que certaines pathologies, dont la maladie d'Alzheimer et le diabète, altèrent les processus d'apprentissage et de mémorisation. Afin de mieux comprendre l'impact de ces maladies sur les différents systèmes de l'organisme, différents modèles animaux reprenant les caractéristiques de pathologies humaines ont été développés grâce aux progrès réalisés en génie biomoléculaire. Dans le cadre de cette thèse, nous aurons recours à deux types de souris génétiquement modifiées, soit les souris déficientes en apolipoprotéine E et les souris NOD, dans le but d'évaluer l'impact des caractéristiques physiopathologiques de la maladie d'Alzheimer et du diabète de type 1 sur le système glutamatergique.

### **La maladie d'Alzheimer et le rôle de l'apolipoprotéine E**

La Maladie d'Alzheimer (MA) est une pathologie qui touche principalement les personnes âgées et qui se caractérise par une démence progressive menant à la détérioration des fonctions supérieures. La pensée et la mémoire sont les deux premières fonctions altérées et souvent, des troubles affectifs et comportementaux suivent les premiers signes de la maladie. Décrite pour la première fois en 1907 par le neuropathologiste Aloïs Alzheimer, la phase précoce de cette maladie affecte le cortex enthorinal, la région CA1 de l'hippocampe et le noyau basal de Meynert. À



l'échelle cellulaire, cette pathologie est caractérisée sur le plan macroscopique par : A) la présence de plaques séniles et B) d'enchevêtrements neurofibrillaires (Balazs and Leon 1994; Prasad *et al.*, 1998; Ramassamy *et al.*, 2000).

Tout d'abord, les plaques séniles sont reconnus comme étant des dépôts extra-cellulaires retrouvés entre les épines dendritiques des neurones, les astrocytes et les cellules de la microglie. Composées du peptide amyloïde, ces structures macroscopiques serait à même d'altérer la transmission neuronale et d'expliquer les problèmes mnésiques observés dans cette pathologie.

En ce qui concerne les enchevêtrements neurofibrillaires, ce sont de longs filaments plus ou moins denses enroulés sous forme d'hélices que l'on retrouve dans le corps cellulaire et dans les dendrites des neurones affectés. Bien que ces amas cellulaires ne soient pas présents à l'intérieur des neurones sains, la protéine responsable de leur formation est présente dans les cellules en santé et elle essentielle à la fixation et à la stabilisation des microtubules; il s'agit de la protéine Tau (Maccioni *et al.*, 2001). Chez les individus atteints par la maladie d'Alzheimer, les protéines Tau sont anormalement phosphorylées ce qui les rendent inaptes à assurer la stabilité et l'assemblage des microtubules, d'où la formation des hélices observables lors du diagnostic. Sur le plan clinique, l'observation de ces amas cytoplasmiques serait plus révélatrice de l'état de démence que les plaques séniles (Masliah *et al.*, 1995).

Bien que l'on ne connaisse pas les causes exactes de la maladie d'Alzheimer, cinq gènes ont été identifiés chez l'homme comme étant responsable des symptômes associés à la pathologie. Trois d'entre eux, soit le gène codant pour le précurseur de la protéine amyloïde (APP) et les deux gènes de la préséniline, prédisposent à la

forme précoce de la maladie. En ce qui a trait à la forme tardive, cette dernière affecte 98% des patients atteints de la maladie d'Alzheimer et est causée par la présence d'un allèle spécifique du gène codant pour l'apolipoprotéine E (apoE), soit l'allèle  $\epsilon 4$ .

L'apoE humaine est une lipoprotéine abondamment retrouvée dans l'organisme et impliquée dans le métabolisme des lipoprotéines plasmatiques, dans l'homéostasie du cholestérol et dans la réparation du SNC. Présente au niveau du foie, des glandes surrénales et du cerveau, cette protéine est composée de 299 acides aminés et provient d'un gène situé sur le chromosome 19q13.2 (Weisgraber *et al.*, 1994). Du point de vue génétique, trois allèles différents soit  $\epsilon 2$ ,  $\epsilon 3$  et  $\epsilon 4$  vont produire autant de protéines (apoE2, apoE3 et apoE4) qui sont responsables du bon fonctionnement de l'organisme. Au niveau du SNC, l'apoE est synthétisée par les astrocytes et les macrophages. Une fois sécrétées, ces protéines sont prises en charge par les neurones et concentrées dans les terminaisons nerveuses, où elles jouent un rôle dans la plasticité. Conformément à son rôle périphérique, l'apoE est responsable du maintien de l'homéostasie lipidique du SNC et plus particulièrement du transport des phospholipides nécessaires à la réinnervation lors des dommages cérébraux (Poirier 1994). Finalement, cette protéine est aussi grandement impliquée dans le maintien du système synapto-dendritique lors du vieillissement (Masliah *et al.*, 1995).

Afin de mieux comprendre le rôle de l'apoE dans la MA, une souris déficiente pour le gène de l'apoE a été développée. De nombreuses études comportementales, histologiques et biochimiques ont été conduites sur ce modèle et les résultats obtenus reprennent bien les caractéristiques retrouvées chez les patients souffrant de la MA.

Premièrement, les études histologiques ont constaté une diminution des protéines associées aux microtubules (MAPs) de même qu'une hyperphosphorylation des protéines Tau (Masliah *et al.*, 1995). Deuxièmement, une étude biochimique a démontré une diminution de l'activité de l'acétylcholinestérase et de la choline acétyltransférase dans les projections cholinergiques des souris déficientes en apoE (Gordon *et al.*, 1996). Finalement, des problèmes d'apprentissage et de mémorisation ont été rapportés chez ces souris lors d'expériences conduites dans le labyrinthe de Morris. Puisque ces animaux semblent incapables de localiser la plateforme immergée, ceci suggère que l'apoE est bel et bien impliquée dans la reconnaissance de l'environnement et dans les processus de mémorisation.

### **Le diabète mellitus**

Le diabète mellitus est un désordre métabolique caractérisé soit par l'absence de la sécrétion d'insuline (diabète de type 1) ou par la résistance de l'organisme face à cette hormone (diabète de type 2). Plus précisément, le diabète de type 1 est une maladie auto-immune qui survient suite à la destruction sélective des cellules productrices d'insuline, c'est-à-dire les cellules  $\beta$  du pancréas, alors que le diabète de type 2 est caractérisé d'une part par la perte de sensibilité du foie, des muscles et des cellules adipeuses face à l'insuline et d'autre part par une diminution de la sécrétion d'insuline par les cellules du pancréas.

Bien que le diabète soit principalement reconnu pour ces atteintes périphériques, plusieurs études suggèrent que cette pathologie affecte aussi le SNC. D'ailleurs, différents tests neuropsychologiques conduits chez des patients diabéti-

ques ont démontré que la présence de problèmes d'apprentissage, de mémorisation et des déficits au niveau de la résolution de problèmes (Ryan 1988). Malgré le fait que ces atteintes varient selon le test utilisé et la population étudiée, ces déficits cognitifs seraient liés aux fluctuations de la glycémie, c'est-à-dire à l'alternance entre les crises d'hypoglycémie et d'hyperglycémie. Une étude clinique publiée très récemment a d'ailleurs démontré que l'exposition des patients diabétiques à des périodes d'hypo et d'hyperglycémie pouvait générer des dommages structuraux et fonctionnels au niveau du cerveau (Ferguson *et al.*, 2003). De plus, une étude réalisée chez le rat a constaté qu'aucun mécanisme de protection n'est présent au niveau de la barrière hématoencéphalique de ces animaux, ce qui suggère que le tissu cérébral soit exposé aux fluctuations du glucose sanguin (Jacob *et al.*, 2002). Ces observations confirment donc le fait que le SNC puisse être atteint, tout comme le système nerveux périphérique, lors du diabète de type 1.

En ce qui concerne le diabète de type 2, les troubles cognitifs rapportés sont plus modérés que chez les diabétiques de type 1 mais plus circonscrits, c'est-à-dire qu'ils affectent plus particulièrement la concentration, les performances psychomotrices et la mémoire verbale et visuospatiale (Strachan *et al.*, 1997; Gispen and Biessels 2000). Du point de vue clinique, le diabète de type 2 est retrouvé principalement chez les gens obèses et est associé à l'hypertension et à la dyslipidémie. Sur le plan épidémiologiques, il a été rapporté que ce type de diabète affecte 18% des personnes âgées de 65 et 74 ans et plus de 20% chez celles âgées de plus de 80 ans (Gispen and Biessels 2000). De plus, une récente étude conduite à l'Université d'Harvard a révélé que l'incidence de la maladie d'Alzheimer était beaucoup plus importante chez les

patients atteints du diabète de type 2 (Grodstein *et al.*, 2001). Par conséquent, puisque la population est vieillissante et que l'incidence du diabète de type 2 est particulièrement élevée chez les personnes âgées, on peut s'attendre à une augmentation de ce type de diabète au cours des prochaines années, de même qu'à une augmentation des maladies connexes comme la maladie d'Alzheimer et les maladies cardiovasculaires.

Du point de vue expérimental, différents modèles animaux sont utilisés dans le but de comprendre les dommages centraux induits par le diabète de type 1. Bien que plusieurs méthodes aient été utilisées pour induire ce type de diabète (virus, alloxane), le moyen le plus répandu est l'injection intrapéritonéale ou intraveineuse de streptozotocine (STZ), un agent toxique pour les cellules  $\beta$  du pancréas. Utilisant ces animaux comme modèle expérimental, une étude comportementale réalisée dans le labyrinthe Morris a démontré que les rats adultes diabétiques étaient incapables de réaliser certaines tâches associées à l'apprentissage (Biessels *et al.*, 1996; Kamal *et al.*, 1999) et qu'un déficit d'expression de la PLT dépendante et indépendante des RNMDA était présent respectivement dans la région CA1 et CA3 (Chabot *et al.*, 1997; Kamal *et al.*, 1999). Bien que les mécanismes sous-jacents à ces observations demeurent inconnus, la sévérité de l'hyperglycémie semble responsable des déficits de PLT (Biessels *et al.*, 1996).

À l'échelle biochimique, il y a peu d'information disponible quant à l'effet du diabète de type 1 sur les récepteurs glutamatergiques postsynaptiques. Toutefois, il a été démontré que l'affinité des récepteurs AMPA pour le ligand 3H-AMPA, de même que l'expression de la sous-unité GluR1 était diminuée chez les animaux traités à la

STZ (Gagne *et al.*, 1997). Aussi, l'immunoréactivité de la sous-unité NR2B serait diminuée après trois mois de diabète et il en serait de même pour la phosphorylation de NR2A/B (Di Luca *et al.*, 1999). Par conséquent, ces changements associés au RNMDA pourraient expliquer les déficits de PLT observés lors de l'induction du diabète par la STZ.

Malgré l'utilisation importante de ce modèle, sa validité demeure grandement controversée et ce, compte tenu des effets potentiellement toxiques de la STZ. Brièvement, la STZ est un composé cytotoxique qui utilise les transporteurs GLUT2 du glucose pour pénétrer à l'intérieur des cellules  $\beta$  du pancréas. Une fois à l'intérieur, cette substance va diminuer le niveau de NAD et générer des radicaux libres qui vont s'attaquer à l'ADN et endommager les cellules. Puisque le niveau de NAD est relativement faible au niveau des cellules  $\beta$ , ces dernières sont très vulnérables à la STZ, d'où leur destruction par ce composé et la similarité avec le diabète de type 1.

Lorsqu'il est question des études sur le SNC, certains auteurs prétendent que des dommages centraux sont rattachés à l'utilisation de la STZ. D'ailleurs, ils ont démontré que la peroxidation lipidique était quatre fois plus importante au niveau du cerveau (Mukherjee *et al.*, 1994), et que la présence de STZ à l'intérieur des ventricules cérébraux altérerait l'intégrité des membranes lipidique (Muller *et al.*, 1998).

Même si l'injection de la STZ est fréquemment utilisée, d'autres modèles animaux sont commercialisés pour l'étude du diabète de type 1; il s'agit des rats BB/Wor et des souris non obèses diabétiques (NOD). Bien qu'ils soient rarement utilisés, ils offrent une avenue plus intéressante que les rats traités à la STZ puisque l'ambiguïté associée à la toxicité du produit n'a plus lieu d'être. Dans le cas des rats

BB/Wor, ils développent spontanément les caractéristiques physiopathologiques du diabète de type 1 et ce suite à la destruction auto-immune des cellules  $\beta$ . Toutefois, le principal inconvénient rattaché à ce modèle est la courte durée de vie des animaux sans traitement à l'insuline ce qui limite les études sur la phase précoce du diabète (Buschard 1996).

Dans le même ordre d'idée, les souris NOD possèdent plusieurs des caractéristiques physiopathologiques observées chez l'humain dont l'hyperglycémie, l'hypoinsulinémie, la glucosurie, la cétonurie, la polydipsie et la polyurie. De plus, des anticorps dirigés contre les cellules des îlots de Langerhans et contre l'insuline auraient aussi été observés chez ces animaux ce qui leur confère la caractéristique de développer un diabète de type auto-immun (Buschard 1996). Contrairement au diabète induit chimiquement, l'utilisation des souris NOD permet l'étude du diabète dès son déclenchement. En effet, dans le cas des rats traités à la STZ, les études sont souvent réalisées après trois mois de diabète ce qui suggère que les résultats obtenus incluent les modifications compensatoires de l'organisme face à la maladie. Dans cette optique, l'utilisation du modèle NOD permet une meilleure compréhension du rôle de l'hyperglycémie dans les problèmes d'apprentissage et de mémorisation observés lors de la phase précoce du diabète de type 1.

## Les inositols phosphates et leurs rôles à l'échelle du SNC

Au cours des dernières années, un intérêt grandissant s'est développé pour les inositols phosphates qui ont été découvert pour la première fois en 1850 par le Dr Scherer. Présente en grande quantité dans l'alimentation, et plus particulièrement dans les céréales, cette molécule est aussi synthétisée chez les mammifères au niveau du cerveau, des testicules et du rein, ce dernier étant le principal organe impliqué dans le catabolisme et l'excrétion du myo-inositol. Dans le cas du SNC, il a été démontré que la concentration de ce métabolite cellulaire varie entre 2 et 15mM selon la région étudiée et que chez l'humain, cette concentration diminue en fonction de l'âge (Fisher *et al.*, 2002). Par exemple, la concentration d'inositol présente au niveau du lobe temporel passerait de 6mM à 2.7 mM entre 20 et 90 ans (Stokes *et al.*, 1983). Aussi, il est important de mentionner que la préparation de tranches d'hippocampe ou de cortex altère l'intégrité des cellules et mène à la perte de 50 % à 60 % des inositols (Fisher *et al.*, 2002).

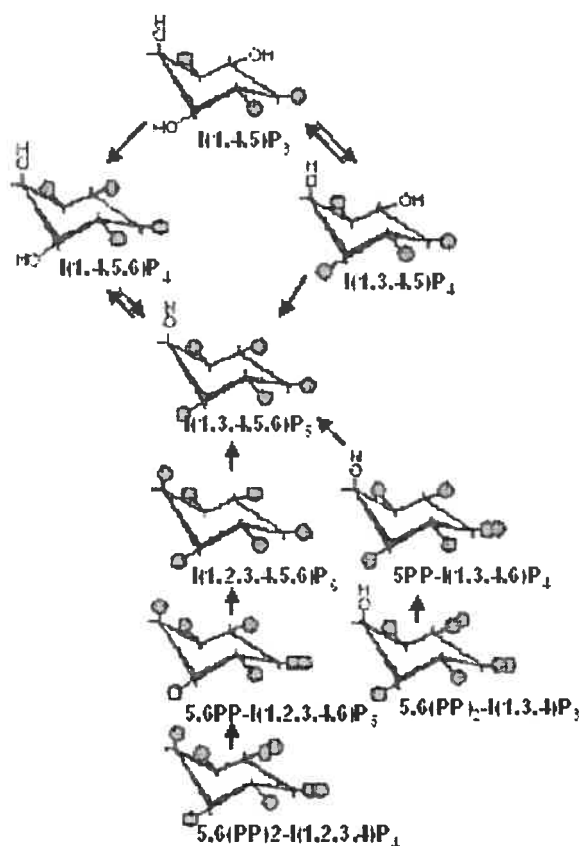
Au niveau cellulaire, la concentration de myo-inositol est maintenue grâce à la présence de transporteurs membranaires, de la synthèse *de novo* du précurseur D-inositol 3-phosphate et de la diffusion facilitée (Fisher *et al.*, 2002). Premièrement, la transition des myo-inositols du plasma aux cellules nerveuses dépend des transporteurs Na<sup>+</sup>/myo-inositol et des symporteurs H<sup>+</sup>/ myo-inositol qui sont retrouvés respectivement dans la littérature sous les abréviations SMIT (« Sodium Myo-Inositol Transporter ») et HMIT (« H<sup>+</sup>- Myo-Inositol Transporter »). Du point de vue clinique, il a été démontré que trois copies du gène codant pour les SIMT étaient présentes



dans le cerveau des patients atteints du Syndrome de Down ce qui a pour conséquence d'augmenter de façon significative la concentration d'inositol dans le cerveau des personnes atteintes (30 % à 50 %) (Berry *et al.*, 1999). Deuxièmement, la synthèse *de novo* du myo-inositol proviendrait de la transformation du glucose-6-phosphate en D-inositol 3-phosphate par la D-inositol 3-phosphate synthase. Par la suite, cette molécule intermédiaire est hydrolysée par l'IMPase (Inositol Monophosphatase) pour former le myo-inositol tel qu'il est retrouvé dans le SNC. Troisièmement, la présence de canaux VSOAC ATP-dépendants au niveau des neurones et des cellules gliales permet, lors d'un stress hypotonique, la diffusion facilitée du *myo*-inositol dans l'espace extracellulaire et le maintien l'homéostasie. Toutefois, lors d'une ischémie cérébrale, le manque d'ATP nécessaire au fonctionnement des VSOAC entraîne le gonflement des cellules et mène à la mort neuronale (Fisher *et al.*, 2002).

Bien que le myo-inositol soit associé au Syndrome de Down et à l'ischémie cérébrale, il est nécessaire à la synthèse des inositols polyphosphates qui assurent le bon fonctionnement du SNC. Parmi ceux-ci, on retrouve le D-myo-inositol 1,2,3,4,5,6-hexakisphosphate (InsP6), le D-myo-inositol 1,3,4,5-tetrakisphosphate (InsP4) et le D-myo-inositol 1,3,4,5,6-pentakisphosphate (InsP5). Caractérisé pour la première fois en 1914 par le Dr Anderson, l'inositol hexakisphosphate (InsP6) est retrouvé principalement dans les végétaux, dans les céréales et dans le cerveau humain, où sa concentration intracellulaire varie entre 10  $\mu$ M et 15  $\mu$ M selon les structures étudiées (Yang *et al.*, 2001). Alors que la synthèse de l'InsP6 découle, chez les végétaux, du mécanisme mentionné précédemment, celui responsable de sa synthèse

chez l'humain demeure incertain puisque cette cascade enzymatique n'est pas retrouvée chez les mammifères. En fait, l'InsP6 proviendrait de la phosphorylation successive de l'I(1,4,5)P<sub>3</sub>, de l'I(1,3,4,5)P<sub>4</sub> et finalement de l'I(1,3,4,5,6)P<sub>5</sub> par une série de kinases nommée « inositol polyphosphate multikinase » ou mIPMK (Saiardi *et al.*, 2001).



**Figure 8. Synthèse et dégradation des inositols polyphosphates** (adaptée de S.K. Fisher *et al.*, 2002).

À l'échelle fonctionnelle, les inositols polyphosphates (InsP<sub>4</sub>, l'InsP<sub>5</sub> et l'InsP<sub>6</sub>) inhibent la neurotransmission en se liant au domaine C2B de la synaptotagmine, une protéine intrinsèque à la membrane responsable de l'exocytose des vésicules synaptiques. Par conséquent, il est suggéré que les inositols polyphosphates préviennent la fusion des vésicules synaptiques avec la membrane et par conséquent

l'exocytose au niveau du terminal présynaptique (Mikoshiba *et al.*, 1999; Lu *et al.*, 2002). Aussi, dans le cas précis de l'InsP6, ce dernier favoriserait la sécrétion d'insuline par les cellules  $\beta$  du pancréas en plus d'inhiber les phosphatases de type 1, 2 et 3, et d'activer la protéine kinase C (Efanov *et al.*, 1997; Larsson *et al.*, 1997; Barker *et al.*, 2002). Concernant l'endocytose, l'implication des inositols polyphosphates demeurent relativement peu connue. Toutefois, il a été démontré que la liaison de l'InsP6 aux protéines adaptatrices AP-2 et AP-3 prévenait l'assemblage de la cage de clathrine de même que le recrutement de l'AP-2 nécessaire à l'endocytose des cellules épithéliales du rein (Timerman *et al.*, 1992; Voglmaier *et al.*, 1992; Ogi-moto *et al.*, 2000). Parallèlement, il a récemment été rapporté que la sous-unité GluR2 des récepteurs AMPA était associée à la protéine adaptatrice AP-2 (Man *et al.*, 2000). Par conséquent, bien que peu d'information soit disponible concernant le rôle des inositols polyphosphates dans le processus d'endocytose, nous suggérons que ces molécules, et plus particulièrement l'InsP6, soient à même de réguler le mouvement des RAMPs dans la membrane synaptique.

## Hypothèses et Objectifs

Depuis sa découverte en 1973, la PLT est reconnue comme étant le principal modèle électrophysiologique susceptible d'expliquer les mécanismes sous-jacents au processus de mémorisation. D'ailleurs, les problèmes d'apprentissage et de mémorisation observés chez l'animal sont souvent corrélés à un déficit d'expression de ce phénomène électrophysiologique. Au niveau cellulaire, plusieurs chercheurs suggèrent que la PLT soit associée à des modifications post-traductionnelles des récepteurs glutamatergiques. Par conséquent, si nous adhérons à cette hypothèse, il est logique de penser que les problèmes d'apprentissage et de mémorisation soient associés à des perturbations du système glutamatergique. Dans cette optique, nous avons émis comme hypothèse principale que les déficits cognitifs retrouvés chez les modèles animaux utilisés pour l'étude de la maladie d'Alzheimer (souris déficientes en apolipoprotéine E) et du diabète de type 1 (souris NOD) devraient se refléter au niveau de l'expression de la PLT et des propriétés biochimiques des récepteurs glutamatergiques de type ionotrope.

Dans un premier temps, nous nous sommes intéressés à la régulation des récepteurs glutamatergiques de type AMPA de même qu'à l'expression de la PLT dans la région CA1 des souris déficientes en apoE. Puisque certaines études ont démontré une diminution de la PLT de même que des problèmes d'apprentissage chez ces animaux (Krzywkowski *et al.*, 1999; Veinbergs and Masliah 1999; Champagne *et al.*, 2002), notre premier objectif spécifique a été d'évaluer l'état des AMPA de même que leur régulation par l'environnement lipidique. De plus, une attention particulière

a été portée aux souris âgées étant donné que ce modèle animal arbore les caractéristiques physiopathologiques d'une maladie associée au vieillissement.

Deuxièmement, nous nous sommes intéressés aux problèmes cognitifs rapportés lors du diabète de type 1 (Gispen and Biessels 2000). Puisque des déficits d'apprentissage ont été observés chez des rats traités à la STZ (Franceschi *et al.*, 1984; Biessels *et al.*, 1996; Gispen and Biessels 2000), notre deuxième objectif spécifique a été d'évaluer l'impact du diabète de type 1 sur le système glutamatergique et sur le phénomène de la PLT. Pour ce faire, nous avons eu recours à un modèle de souris génétiquement prédisposées au diabète de type 1, les souris NOD, dans le but d'éliminer l'ambiguïté relative à la toxicité de la STZ au niveau du cerveau. Par conséquent, cette deuxième étude a mis en lumière les caractéristiques biochimiques des récepteurs AMPA et NMDA de même que leur capacité à potentialiser la transmission synaptique.

Dans la troisième partie de ce manuscrit, nous nous sommes intéressés aux mécanismes responsables du mouvement des récepteurs glutamatergiques, et plus particulièrement du rôle de l'InsP6 dans ce phénomène. Puisque cet inositol inhibe l'assemblage de la cage de clathrine et que les RAMPs semblent internaliser via un mécanisme clathrine-dépendant (Volgmaier 1992), notre troisième objectif spécifique a été d'évaluer l'impact de l'InsP6 sur l'endocytose des récepteurs glutamatergiques de type AMPA et NMDA.

Afin de répondre à chacun des objectifs mentionnés ci-dessus, nous avons combiné sur le plan expérimental l'utilisation des techniques électrophysiologiques et

biochimiques. Dans un premier temps, les enregistrements électrophysiologiques effectués dans la région hippocampale nous ont permis d'évaluer l'impact de l'état pathologique sur la transmission synaptique assurée par le système glutamatergique. Dans un deuxième temps, les propriétés de liaison des récepteurs au glutamate de même que leur régulation par différents composés endogènes tels que le calcium et la phosphatidylsérine (PS) ont été étudiées par autoradiographie quantitative. Finalement, les centrifugations différentielles et l'immunobuvardage de type Western ont permis d'approfondir les connaissances relatives à la localisation et à la proportion des sous-unités présentes dans chacune des fractions cellulaires.

En terminant, nous espérons que ces différentes techniques nous permettront de mettre en lumière les altérations subies par les récepteurs glutamatergiques lors des problèmes d'apprentissage et de mémorisation

# **CHAPITRE 2**

## **Première partie**

### **RÉGULATION DES RÉCEPTEURS GLUTAMATERGIQUES DE TYPE AMPA CHEZ DES SOURIS ADULTES ET ÂGÉES DÉFICIENTES EN APOLIPOPROTÉINE E.**

## **AMPA receptor regulation and LTP in the hippocampus of young and aged apolipoprotéine E-deficient mice**

Barbara Valatro<sup>1,2</sup>, Othman Ghribi<sup>1</sup>, Judes Poirier<sup>3</sup>,  
Pascale Krzywkowski<sup>3</sup>, Guy Massicotte<sup>1,2</sup>.

<sup>1</sup>Département de Chimie-Biologie, Université du Québec à Trois-Rivières; <sup>2</sup>Département de Pharmacologie, Université de Montréal;  
<sup>3</sup>McGill Center for Studies in Aging.

Article publié dans  
Neurobiology of Aging 22(2001) : 9-15.



## ***Abstract***

In the present study, modulation of  $\alpha$ -amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazole propionate (AMPA) receptors by phosphatidylserine (PS) and synaptic plasticity were investigated in the hippocampus of young (4-month-old) and aged (18-month-old) apolipoprotein E (apoE)-deficient mice. Qualitative as well as quantitative analysis of brain sections in both young and aged apoE-deficient mice did not reveal any substantial changes of AMPA receptor binding in the various hippocampal regions, compared to age-matched controls. Nevertheless, enhancement of AMPA receptor binding elicited by PS treatment was found to be abolished in most hippocampal regions of young apoE-deficient mice, while modulation of AMPA receptors by this phospholipid was not significantly altered in the hippocampal formation of aged apoE-deficient animals. At the electrophysiological level, long-term potentiation (LTP) induced by theta burst stimulation was lower in area CA1 of the hippocampus of young, but not aged, apoE-deficient mice compared to age-matched controls. These results confirm that apoE is important for AMPA receptor regulation and LTP expression in the hippocampal formation. However, the presence of LTP in aged apoE-deficient animals, together with apparent recovery of the PS action on AMPA receptors, suggests that aged apoE-knockout mice possess compensatory mechanisms that reduce biochemical and electrophysiological alterations of glutamatergic neurons.

**Author Keywords:** Alzheimer's disease; Apolipoprotein E; Knockout; Plasticity; AMPA receptors; Phosphatidylserine.

## ***Introduction***

Apolipoprotein E (apoE) has been proposed to act as a potent regulator of lipid homeostasis in peripheral organs and in the central nervous system (CNS). In particular, apoE appears to be responsible for the transport and delivery of phospholipid precursors required for the synthesis of acetylcholine in the brain [33]. ApoE also coordinates cholesterol transport during reinnervation of the injured CNS [33 and 35] and may have a role in maintaining the integrity of the synapto-dendritic apparatus during normal aging [22]. A good deal of experimental evidence indicates that altered cellular metabolism of apoE contributes to the neuropathology and cognitive deficits that develop in Alzheimer's disease [9 and 37]. Consistent with this idea are findings that apoE-deficient mice fail to induce compensatory synaptogenesis in response to brain deafferentation [21 and 34] and display spatial learning deficits in comparison to age-matched controls [11, 15 and 31]. Interestingly, apoE-deficient mice were observed to have developed significant changes in the expression of hippocampal long-term potentiation (LTP), an electrophysiological model of learning and memory, which strongly supports the notion that apoE plays an important role in maintaining the functional integrity of the CNS. In fact, recent studies have demonstrated that LTP, as measured in the population spike, is significantly reduced in hippocampal CA1 and dentate gyrus areas of aged apoE-deficient mice (8–15 months of age) [14, 39 and 40]. Moreover, recordings of field excitatory postsynaptic potentials (fEPSPs) in area CA1 of hippocampal slices have shown that LTP was markedly decreased in young apoE-deficient mice (3-month-old) when compared to age-matched controls

[15]. In several brain regions, LTP induction appears to be strongly dependent on N-methyl-D-aspartate (NMDA) receptor stimulation [1], while it is generally accepted that the changes in synaptic function observed with LTP could result, at least in part, from modifications of postsynaptic currents mediated by the  $\alpha$ -amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazole propionate (AMPA) subtype of glutamate receptors [4, 12, 18, 27 and 28]. In this regard, several studies have reported that LTP expression may involve the uncovering of functional AMPA receptors in area CA1 of hippocampal slices that, prior to LTP, were either not present in postsynaptic membranes or electrophysiologically silent [12 and 18]. This hypothesis, which assumes the appearance of a significant number of new functional non-NMDA receptors during synaptic potentiation, is indeed consistent with previous observations showing that AMPA receptor subunits and  $^3\text{H}$ -AMPA binding are augmented after LTP induction [5, 20, 29 and 38]. The exact biochemical mechanisms underlying LTP expression are still a matter of debate, but a large number of experiments support the notion that activation, by calcium, of protein kinases and proteases could be critical with regard to changes in AMPA receptor properties during LTP expression [3 and 41]. Moreover, several arguments have been advanced to support the hypothesis that activation of calcium-dependent lipases may be part of the molecular mechanisms involved in LTP. Phospholipase A<sub>2</sub> (PLA<sub>2</sub>) inhibitors have been found to block LTP formation in area CA1 of rat hippocampal slices [25 and 32], and ligand-binding investigations have established that, similarly to LTP induction, PLA<sub>2</sub> selectively enhances AMPA receptor binding in hippocampal membranes [23 and 26]. Although the exact mechanisms by which phospholipases alter AMPA receptors remain unknown, it appears that

changes in the lipid environment of the receptors produce modifications in their conformation, as incorporation of phosphatidylserine (PS) into rat brain sections reproduces the increased affinity of AMPA receptors elicited by calcium-dependent PLA<sub>2</sub> [10]. Given the putative role of AMPA receptors in LTP expression and the recent observation that PLA<sub>2</sub>-induced change in AMPA receptors is altered in the telencephalic membranes of apoE-deficient mice [15], we speculated that the inability of CA1 pyramidal neurons to sustain hippocampal LTP formation in apoE knockout mice could be due to impaired modulation of AMPA receptors by the lipid environment. In the present study, we used binding autoradiography to investigate modulation of AMPA receptor binding by PS treatment in brain sections and searched for differences in PS-induced enhancement of 3H-AMPA binding within different hippocampal areas of apoE-deficient mice. Moreover, since it has been demonstrated that there are age-dependent alterations of neuronal properties in this animal model [22], particular attention was given to comparing AMPA receptor modulation by PS and LTP in the hippocampus of young and aged apoE-knockout mice.

## ***Materials and methods***

### **Animals**

Two-month-old C57/BL6 and apoE-deficient mice were obtained from Jackson Laboratories and aged at the Douglas Hospital Research Centre according to Canadian Council on Animal Care guidelines. The animals were housed 4–6/cage under

a 12-hr light-dark cycle in temperature- and humidity-controlled rooms, with food and water ad libitum.

### **Tissue preparation and quantitative AMPA receptor autoradiography**

For binding studies, 4- and 18-month-old control and apoE-deficient mice ( $n = 5$  of each strain) were sacrificed. Their brains were removed quickly, frozen in isopentane (methyl butane) at  $-20^{\circ}\text{C}$  and then kept at  $-70^{\circ}\text{C}$  until they were sectioned. Frontal or horizontal 10  $\mu\text{m}$ -thick sections were cut in a cryostat and thaw-mounted onto chrome-alum-gelatin-coated slides; they were kept at  $-70^{\circ}\text{C}$  until the day of use. Adjacent sections were preincubated for 60 min in 12 ml of Tris-acetate buffer (100 mM, pH 7.4) containing 100  $\mu\text{M}$  EGTA with and without various concentrations of PS at  $35^{\circ}\text{C}$ . They were then processed for AMPA receptor binding as described previously [24]. In brief, the tissue sections were incubated for 45 min at  $0-4^{\circ}\text{C}$  in Tris-acetate buffer (50 mM, pH 7.4; 100  $\mu\text{M}$  EGTA) containing 50 mM potassium thiocyanate in the presence of 50 nM  $^3\text{H}$ -AMPA (Specific activity 53 Ci mmol $^{-1}$ , NEN-Dupont, Wilmington, DE). Nonspecific binding was defined for both ligands as binding measured in the presence of 1 mM quisqualate. The sections were rinsed in cold incubation buffer twice for 10 sec, once for 5 sec in 50% of the same buffer, followed by 3 dips in distilled water. They were then dried under a stream of warm air and used for autoradiography. In some experiments, specific  $^3\text{H}$ -AMPA binding was determined by measuring the radioactivity remaining in the sections after washing in ice-cold buffer. Dried sections as well as tritium standards (ARC, St. Louis, MO) were exposed to tritium-sensitive film (Amersham Hyperfilm) for 8 days. The films

were processed in Sigma developer and fixer. The optical densities of different brain regions were converted to radioactive units, using tritium standards on the film after measurement with an image analysis system (Imaging Research, MCID, St. Catharines, Ontario).

### **Hippocampal slice preparation for LTP measurement**

Experiments were performed on hippocampal slices [17] prepared from 4- and 18-month-old control and apoE-deficient mice ( $n = 8$  of each strain). Transverse slices were maintained at 35°C in medium containing (in mM) NaCl 124, KCl 5, Na<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1.25, MgCl<sub>2</sub> 1.5, CaCl<sub>2</sub> 2.5, NaHCO<sub>3</sub> 26 and glucose 10. They were exposed to a humidified atmosphere of 95% O<sub>2</sub>: 5% CO<sub>2</sub> and perfused continuously at a flow rate of 1 ml/min. After a 1-hr equilibration period, a glass recording electrode (1–5 M; filled with 2 M NaCl) was positioned in the stratum radiatum of area CA1 of the hippocampus to record fEPSPs evoked by a bipolar electrode (twisted 60 m nichrome) activating fibers of the Schaffer collateral system. Bipolar stimulating electrodes were placed in the stratum radiatum of 2 independent pathways converging on common postsynaptic target cells; the 2 pathways were defined as independent when LTP formation was restricted to the pathway receiving theta burst stimulation (TBS). After a 20-min baseline period during which responses were recorded every 30 sec., TBS (10 bursts of 4 stimulation pulses at 100 Hz) were delivered at 200-msec intervals. In all cases, the response to stimulation was quantified by calculating the initial slope of the resulting fEPSP. In most cases, groups were compared by 1-way

analysis of variance followed by Scheffe's posthoc analysis with conventional criteria of statistical significance:  $p$  values  $< 0.05$ .

## ***Results***

### **PS-induced modulation of AMPA receptors in mouse brain sections**

Previous studies in our laboratory have shown that PS incorporation in rat brain tissues enhances the affinity of AMPA receptors [10]. To assess the influence of PS on mouse brains, horizontal sections from 4-month-old control mice were preincubated at 35°C for 60 min in Tris-acetate buffer containing various PS concentrations. After washing in Tris-acetate buffer, the sections were incubated with 50 nM of 3H-AMPA for 45 min at 0°C, and specific 3H-AMPA binding was determined by measuring the radioactivity remaining in the sections after washing in ice-cold buffer. Consistent with previous data in rats, we found that preincubation of thin frozen-thawed sections with PS results in a dose-dependent increase 3H-AMPA binding (Figure 1). A significant rise in 3H-AMPA binding was observed at 0.03 mM PS and maximal elevation was obtained at concentrations between 0.5 and 0.8 mM PS.

Brain sections were preincubated with 0.5 mM PS and then subjected to quantitative 3H-AMPA ligand binding autoradiography. In young controls, visual examination by autoradiography clearly revealed increased binding in the hippocampus and other brain structures after PS treatment (Figure 2). The results illustrated in Figure 3 show that the heightened 3H-AMPA binding elicited by PS preincubation was not uniformly distributed in the various regions of the hippocampus. PS produced a 30–

40% increase of 3H-AMPA binding to CA3 and CA1 stratum radiatum, whereas a 20–27% rise was noted in CA3 and CA1 stratum oriens as well as in the dentate gyrus. PS treatment also elicited a 30% increase in the molecular layer of the cerebellum, and a moderate 15% augmentation of 3H-AMPA binding was noted in the inner layers (III–VI) of the parieto-temporal cortex. Among all the regions analyzed, the striatum, the granular layer of the cerebellum and the thalamic nuclei presented the smallest elevations of 3H-AMPA binding.

### **AMPA receptor modulation in the hippocampus of apoE-deficient mice**

The capacity of PS to up-regulate 3H-AMPA binding was also studied in the hippocampus of young and aged apoE knockout mice. At 4 months of age, apoE-deficient mice sections showed a decrease in the capacity of PS to stimulate 3H-AMPA binding in specific areas of the hippocampus (Figure 4A; striped bars). Whereas PS treatment of young controls was found to produce a 25–38% increase in 3H-AMPA binding to CA3, CA1 and DG areas, the same treatment in young apoE-deficient mice evoked only a 5 to 12% elevation of 3H-AMPA binding in these areas of the hippocampus. The histograms in Figure 4B reveal the degree of stimulation of 3H-AMPA binding elicited by PS in aged (18-month-old) mice sections. As in the young controls, increased 3H-AMPA binding was observed in the hippocampus after PS treatment of brain sections prepared from aged controls. In contrast to young apoE-deficient mice, however, PS-induced enhancement of 3H-AMPA binding in the hippocampus was not altered in aged apoE-knockout animals (Figure 4B; striped bars), compared to age-matched controls.



It should be noted that no significant differences in basal 3H-AMPA binding in the hippocampus or any other regions studied were detected between control and apoE-deficient mice (Table 1), suggesting that the decreased effect of PS on AMPA binding observed in the various brain regions of apoE-deficient mice was not due to major differences in basal binding to the AMPA receptors. Sections from young (Figure 4A; black bars) and aged (Figure 4B; black bars) non-transgenic controls were compared to statistically test for aging effects on AMPA receptor modulation by PS treatment. Whereas the PS-induced enhancement of AMPA receptor binding was found to be consistently lower in the hippocampal region, this difference did not reach statistical significance when compared to young controls.

### **LTP in young and aged apoE-deficient mice**

Since modulation of AMPA receptor properties appears to be necessary for LTP expression, it is reasonable to propose that age-dependent changes in PS action in apoE-deficient mice might also be associated with modifications in LTP magnitude and time course. Hippocampal slices were prepared from young and aged apoE-deficient mice (and from their age-matched controls) and perfused for 2 to 3 hr with ACSF before applying TBS to the Schaffer commissural pathway. TBS used to elicit LTP consisted of 10 high frequency bursts (4 pulses at 100 Hz) repeated at 5 Hz [16]. During the experiments, responses were tested at 30-sec intervals for at least 10 min prior to TBS and again for at least 40 min after TBS; it should be noted that the response size selected for the baseline period was set at half-maximal, as determined from the I/O curve of each slice.

In the young controls, TBS produced an initial increase in the slope of fEPSPs that decayed over a period of about 15 min (Figure 5). Following this typical short-term potentiation (STP), the potentiated responses remained stable for the duration of the experiments. Four evoked responses were averaged 2.0 and 40 min after TBS to evaluate whether STP and LTP were modified in apoE-deficient mice. As shown in Figure 5A, there were no significant alterations in STP in young apoE-deficient mice compared to age-matched controls ( $75 \pm 12\%$  for control mice vs.  $98 \pm 12\%$  for apoE-knockout mice;  $N = 8$ ). However, statistical comparisons revealed that the LTP remaining after 40 min was significantly smaller in young apoE-deficient mice ( $24 \pm 6\%$ ) compared to their young controls ( $57 \pm 7\%$ ;  $N = 7$ ,  $p < 0.05$ ; t-test). Finally, in aged apoE-deficient mice, we demonstrated that LTP induced by TBS was similar in both magnitude and time course in comparison to their age-matched control counterparts (Figure 5B).

## ***Discussion***

Our data confirm the previously-reported observation in rats that preincubation of mice brain sections with PS resulted in increased 3H-AMPA binding [10]. In the present study, we also demonstrated that the PS-induced enhancement of AMPA binding was altered in brain sections from apoE-deficient mice. In the young apoE-deficient group, quantitative autoradiography revealed that all hippocampus regions were less sensitive to PS when compared to age-matched controls, whereas modulation of AMPA receptors by PS treatment was found not to be affected in the various hippocampal areas of aged apoE-deficient mice. At the electrophysiological level, we

also observed that the magnitude of LTP in area CA1 of hippocampal slices was significantly smaller in young (but not aged) apoE-deficient mice compared to age-matched controls. ApoE is believed to play an important role in cholesterol transport for proper cholesterol turnover [19], and it is well-known that during CNS injury, translocation of apoE, cholesterol and phospholipids is necessary for synaptic repair [34]. The involvement of membrane cholesterol in synaptic plasticity is currently unknown, although recent studies have shown that other membrane lipids may contribute to several aspects of LTP. For example, there is a great deal of evidence that arachidonic acid plays a role in LTP; it enhances the synaptic response, it increases glutamate release, and its concentration is elevated in the synaptic cleft following LTP induction [13]. Since arachidonate has been proposed to act as a retrograde messenger for the enhancement of transmitter release during LTP [6], it might be argued that the LTP impairment we observed in young apoE-deficient mice could be due to inappropriate production and/or action of arachidonate after LTP induction. Alternatively, the inability of Schaffer collateral/commissural synapses of the hippocampus to display LTP in young apoE-deficient mice could reflect altered cellular processes associated with LTP expression or the lack of mechanisms involved in LTP induction, such as calcium influx through the NMDA receptor channel. However, the recent observation that both the biochemical and electrophysiological properties of NMDA receptors were not altered in young apoE-deficient mice is certainly not consistent with this contention [15]. It is of interest that similarly to the appearance of LTP, treatment of brain sections with PS was seen to be accompanied by increased AMPA receptor binding in the adult rat hippocampus, with little change in 3H-glutamate

binding to NMDA receptors [10, 20 and 38]. In fact, several lines of experimental evidence have prompted the hypothesis that phospholipid-induced modification of AMPA receptors is an important component of synaptic plasticity [7]. Here, PS-induced change in AMPA receptor properties is found to be altered in brain sections from young apoE-knockout mice, suggesting that the lack of LTP noted in these animals could be attributed to abnormal modulation of AMPA receptors. Consistent with this idea are studies showing that LTP is impaired in rats during diabetes [8] and during the developmental period [2], two other experimental conditions where PS treatment of brain sections does not increase 3H-AMPA binding [8 and 10]. Our results indicated that LTP induced by TBS was lower in area CA1 of the hippocampus of young, but not aged, apoE-deficient mice compared to age-matched controls. In contrast to the present study, Veinbergs et al. (1998) reported that LTP, as measured in the population spike, is significantly reduced in the perforant pathway of aged apoE-deficient mice. However, the same group also reported that aged apoE-deficient mice display normal LTP in evoked fEPSPs [39], which is consistent with the present investigation demonstrating no significant differences in synaptic plasticity within the CA1 region of 18-month-old apoE-deficient mice. Of course, the apoE-knockout is a model of Alzheimer's disease, and the present results did not provide clear-cut conclusions regarding the relationship of the degree of LTP and the performance of apoE-deficient mice in learning tasks requiring the hippocampal structure. In fact, despite a higher level of LTP in area CA1 of aged knockout mice, it appears that both young and aged apoE-knockout mice are poor learners in the Morris maze test [15, 31 and 40]. It should be mentioned that the exact relationship between the magnitude of

LTP and performance in hippocampal-dependent learning tasks is still highly debated and controversial, since it proved difficult to assign the memory deficit for specific learning tasks solely to the lack of LTP in the hippocampal formation [30 and 36]. Regardless of this specific issue, the present study further confirms that apoE status is important for controlling synaptic plasticity and supports the notion that impairment of AMPA receptor regulation by the lipid environment in the hippocampus of young apoE-deficient mice might be associated with LTP deficits. The presence of LTP in aged apoE-deficient animals, together with apparent recovery of the PS action on AMPA receptors, also indicates that aged apoE-knockout mice might possess compensatory mechanisms which reduce biochemical and electrophysiological alterations of glutamatergic neurons. Identifying the mechanisms by which the recovery effects are exerted in aged apoE-deficient mice may provide important information about the cellular processes capable of maintaining synaptic integrity during aging.

**Acknowledgements:** This research was supported by grants from the Natural Sciences and Engineering Research Council of Canada (G.M.), the Medical Research Council of Canada (J.P.), the Alzheimer Society of Canada (J.P.) and the Mental Health Network of Fonds de la Recherche en Santé du Québec (J.P., G.M.). O.G. is the recipient of a fellowship from the Alzheimer Society of Canada. We thank Luc Marchand for his excellent technical assistance and Ovid Da Silva for editing this manuscript.

## References

1. A. Artola, S. Broecher and W. Singer, Different voltage-dependent thresholds for inducing long-term depression and long-term potentiation in slices of rat visual cortex. *Nature* 347 (1990), pp. 69–72.
2. M. Baudry, D. Arst, M. Oliver and G. Lynch, Development of glutamate binding sites and their regulation by calcium in rat hippocampus. *Brain Res* 227 (1981), pp. 37–48.
3. Baudry M, Lynch G. Long-term potentiation: biochemical mechanisms. In: Baudry M, Thompson RF, Davis JL. Book, Cambridge: MIT Press; 1993:87–116.
4. T.A. Benke, A. Luthi, J.T. Isaac and G.L. Collingridge, Modulation of AMPA receptor unitary conductance by synaptic activity. *Nature* 393 (1998), pp. 793–797.
5. J. Bernard, A. Lahsaini and G. Massicotte, Potassium-induced long-term potentiation in area CA1 of the hippocampus involves phospholipase activation. *Hippocampus* 4 (1994), pp. 447–453.
6. T.V. Bliss and G.L. Collingridge, A synaptic model of memory: long-term potentiation in the hippocampus. *Nature* 361 (1993), pp. 31–39.
7. C.A. Borghese, R.A. Gomez and O.A. Ramirez, Phosphatidylserine increases hippocampal synaptic efficacy. *Brain Res Bull* 31 (1993), pp. 697–700.
8. C. Chabot, G. Massicotte, M. Milot, F. Trudeau and J. Gagné, Impaired modulation of AMPA receptors by calcium-dependent processes in streptozotocin-induced diabetic rats. *Brain Res* 768 (1997), pp. 249–256.
9. M.R. Farlow, Alzheimer's disease: Clinical implications of the apolipoprotein E genotype. *Neurology* 48 (1997), pp. S30–S34.
10. J. Gagné, C. Giguère, G. Tocco, M. Ohayon, R.F. Thompson, M. Baudry and G. Massicotte, Effect of phosphatidylserine on the binding properties of glutamate receptors in brain sections from adult and neonatal rats. *Brain Res* 740 (1996), pp. 337–345.
11. I. Gordon, E. Grauer, I. Genis, E. Sehayek and D.M. Michaelson, Memory deficits and cholinergic impairments in apolipoprotein E-deficient mice. *Neurosci Lett* 199 (1995), pp. 1–4.
12. J.T.R. Isaac, R.A. Nicoll and R.C. Malenka, Evidence for silent synapses: Implications for the expression of LTP. *Neuron* 15 (1995), pp. 427–434.

13. A. Kelly and M.A. Lynch, LTP occludes the interaction between arachidonic acid and ACPD and NGF and ACPD. *NeuroReport* 9 (1998), pp. 4087–4091.
14. H.J. Krugers, M. Mulder, J. Korf, L. Havekes, R. de Kloet and M. Joels, Altered synaptic plasticity in hippocampal CA1 area of apolipoprotein E deficient mice. *NeuroReport* 8 (1997), pp. 2505–2510.
15. P. Krzywkowski, O. Ghribi, J. Gagné, C. Chabot, S. Kar, J. Rochford, G. Massicotte and J. Poirier, Cholinergic systems and long-term potentiation in memory-impaired apolipoprotein E-deficient mice. *Neurosci* 92 (1999), pp. 1273–1286.
16. J. Larson and G. Lynch, Role of N-Methyl-D-Aspartate receptors in the induction of synaptic potentiation by burst stimulation patterned after the hippocampal theta rhythm. *Brain Res* 441 (1988), pp. 111–118.
17. Lee K, Oliver M, Schottler F, Lynch G. Electron microscopic studies of brain slices: the effects of high frequency stimulation on dendritic ultrastructure. In: Kerkut G, Wheal HV. Book, New York: Academic Press; 1981:189–212.
18. D. Liao, N.A. Hessler and R. Malinow, Activation of postsynaptically silent synapses during pairing-induced LTP in CA1 region of hippocampal slice. *Nature* 375 (1995), pp. 400–404.
19. R.W. Mahley, Apolipoprotein E: Cholesterol transport protein with expanding role in cell biology. *Science* 240 (1988), pp. 622–630.
20. S. Maren, G. Tocco, S. Standley, M. Baudry and R.F. Thompson, Postsynaptic factors in the expression of long-term potentiation (LTP): Increased glutamate receptor binding following LTP induction in vivo. *Proc Nat Acad Sci (USA)* 90 (1993), pp. 9654–9658.
21. Masliah E, Mallory M, Alford M, Ge N, Mucke L. Abnormal synaptic regeneration in hAPP695 transgenic and APOE knockout mice. In: Iqbal K, Mortimer JA, Winblad B, Wisniewski HM. Book, New York: John Wiley and Sons; 1995:405–14.
22. E. Masliah, M. Mallory, N. Ge, M. Alford, I. Veinbergs and A.D. Roses, Neurodegeneration in the central nervous system of apoE-deficient mice. *Exp Neurol* 136 (1995), pp. 107–122.
23. G. Massicotte and M. Baudry, Modulation of AMPA/Quisqualate receptors by phospholipase A2 treatment. *Neurosci Lett* 118 (1990), pp. 245–248.
24. G. Massicotte, M. Kessler, G. Lynch and M. Baudry, N-Methyl-D-Aspartate and Quisqualate/AMPA receptors: Differential regulation by Phospholipase C treatment. *Mol Pharmacol* 32 (1990), pp. 278–285.

25. G. Massicotte, M.W. Oliver, G. Lynch and M. Baudry, Effect of bromophenacyl-bromide, a Phospholipase A2 inhibitor, on the induction and maintenance of LTP in hippocampal slices. *Brain Res* 537 (1990), pp. 49–53.
26. G. Massicotte, P. Vanderklish, G. Lynch and M. Baudry, Modulation of AMPA/Quisqualate receptors by Phospholipase A2: A necessary step in long-term potentiation. *Proc Nat Acad Sci (USA)* 88 (1991), pp. 1893–1897.
27. D. Muller, M. Joly and G. Lynch, Contributions of quisqualate and NMDA receptors to the induction and expression of LTP. *Science* 242 (1988), pp. 1694–1697.
28. D. Muller and G. Lynch, Long-term potentiation differentially affects two components of synaptic responses in hippocampus. *Proc Natl Acad Sci (USA)* 85 (1988), pp. 9346–9350.
29. A. Nayak, D.J. Zastrow, R. Lickteig, N.R. Zahniser and M.D. Browning, Maintenance of late-phase is accompanied by PKA-dependent increase in AMPA receptor synthesis. *Nature* 394 (1998), pp. 680–683.
30. M. Nosten-Bertrand, M.L. Errington, K.P.S.J. Murphy, Y. Tokugawa, E. Barboni, E. Kozlova, D. Michalovich, R.G.M. Morris, J. Silver, C.L. Stewart, T.V.P. Bliss and R.J. Morris, Normal spatial learning despite regional inhibition of LTP in mice lacking Thy-1. *Nature* 379 (1996), pp. 826–829.
31. M.S. Oitzl, M. Mulder, P.J. Lucassen, L.M. Havekes, J. Grootendorst and E.R. de Kloet, Severe learning deficits in apolipoprotein E-knockout mice in a water maze task. *Brain Res* 752 (1997), pp. 189–196.
32. D. Okada, S. Yamagishi and H. Sugiyama, Differential effects of phospholipase inhibitors in long-term potentiation in the rat hippocampal mossy fiber synapses and Schaffer/commissural synapses. *Neurosci Lett* 100 (1989), pp. 141–146.
33. J. Poirier, Apolipoprotein E in animal models of CNS injury and in Alzheimer's disease. *Trends Neurosci* 17 (1994), pp. 525–530.
34. J. Poirier, A. Baccichet, D. Dea and S. Gauthier, Cholesterol synthesis and lipoprotein reuptake during synaptic remodeling in hippocampus of adult rats. *Neurosci* 55 (1993), pp. 81–90.
35. J. Poirier, A. Minnich and J. Davignon, Apolipoprotein E, Synaptic plasticity and Alzheimer's Disease. *Ann Med* 27 (1995), pp. 663–670.
36. T.J. Shors and L.D. Matzel, Long-term potentiation: what's learning got to do with it?. *Behav Brain Res* 20 (1997), pp. 597–655.



37. W.J. Strimatter and A.D. Roses, Apolipoprotein E and Alzheimer disease. *Proc Natl Acad Sci (USA)* 92 (1995), pp. 4725–4727.
38. G. Tocco, S. Maren, T. Shors, M. Baudry and R.F. Thompson, Long-term potentiation is associated with increased 3H-AMPA binding in rat hippocampus. *Brain Res* 573 (1992), pp. 228–234.
39. I. Veinbergs, M.W. Jung, S.J. Young, E. Van Uden, P.M. Groves and E. Masliah, Altered long-term potentiation in the hippocampus of apolipoprotein E-deficient mice. *Neurosci Lett* 249 (1998), pp. 71–74.
40. I. Veinbergs, M. Mante, M.W. Jung, E. Van Uden and E. Masliah, Synaptotagmin and synaptic transmission alterations in apolipoprotein E-deficient mice. *Prog Neuro-Psychopharmacol Biol Psychiat* 23 (1999), pp. 519–531.
41. J. Wang and P.T. Kelly, The balance between postsynaptic  $\text{Ca}^{2+}$ -dependent protein kinase and phosphatase activities controlling synaptic strength. *Learn Mem* 3 (1996), pp. 170–181.

### **Figure legends**

**Fig. 1. Effect of phosphatidylserine on 3H-AMPA binding in mouse brain sections.** Adjacent coronal sections at the level of the dorsal hippocampus were preincubated at 35°C in Tris acetate buffer (100 mM, pH 7.4, containing 100 M EGTA) in the presence of different PS concentrations. They were then washed in buffer alone and processed for 3H-AMPA binding, as described in Materials and Methods. The results are expressed as percent specific binding measured in sections preincubated with buffer alone and are means  $\pm$  SEM of values obtained from 5 different experiments.

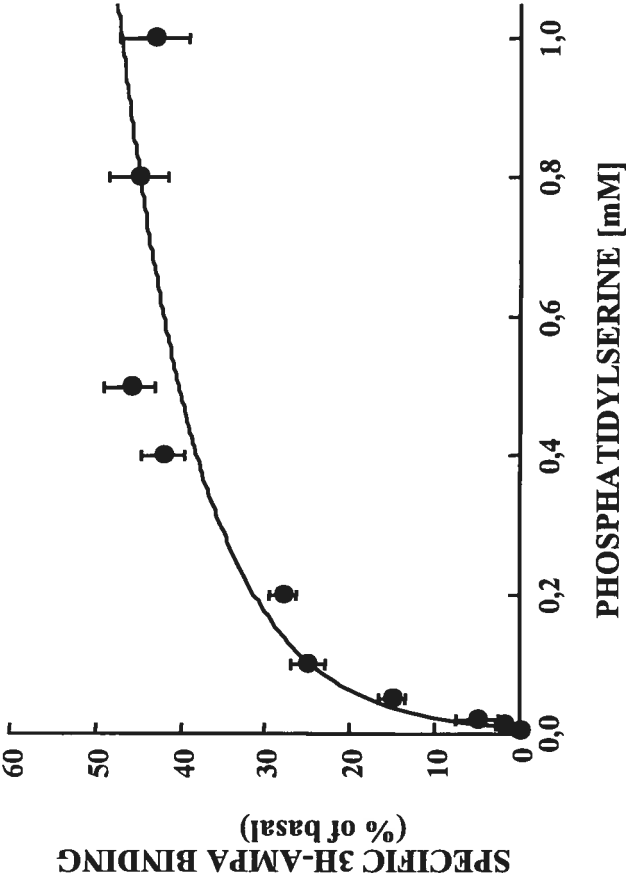
**Fig. 2. Effect of phosphatidylserine treatment on 3H-AMPA binding in mouse sections.** Adjacent horizontal sections were preincubated at 35°C for 1 hr in Tris-acetate buffer (100 mM, pH 7.4, containing 100 M EGTA) without (A) or with (B) 0.5 mM of PS. They were then washed in buffer alone and processed for 3H-AMPA binding. Autoradiographs were obtained as described in Materials and Methods.

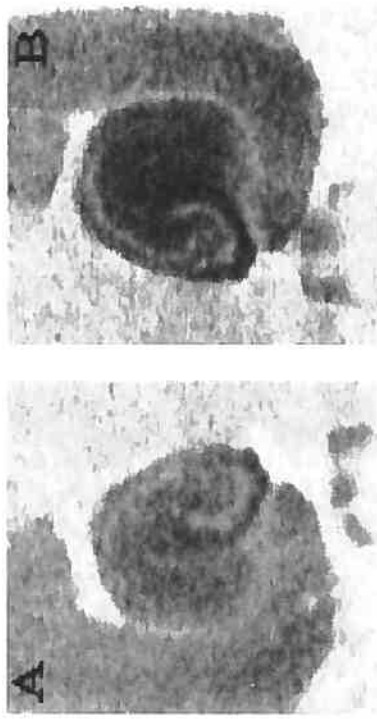
**Fig. 3. Effect of phosphatidylserine treatment on 3H-AMPA binding in different areas of the mouse brain.** Adjacent horizontal sections prepared from young controls were preincubated at 35°C for 1 hr in Tris-acetate buffer (100 mM, pH 7.4, containing 100 M EGTA) without (black bars) or with (striped bars) 0.5 mM PS. Autoradiographs, as shown in Figure 2A and 2B, were analyzed using an image analysis system, and the results are expressed in pmol/mg of protein obtained for different regions of the mouse brain. OR, stratum oriens; RAD, stratum radiatum; DG, molecular layer of the dentate gyrus; ICX, inner (III–VI) layers of the parieto-temporal cortex; ECX, outer layers (I–II) of the same cortex; STRIA, striatum; GRAN, granular layer of the cerebellum; MOL, molecular layer of the cerebellum; THAL, thalamic nuclei. The data are means  $\pm$  SEM of at least 8 different measurements per mouse in 5 different mice. \*Statistical significance compared to basal values. \* $P < 0.05$ ; \*\* $P < 0.01$  versus controls, Scheffe's test.

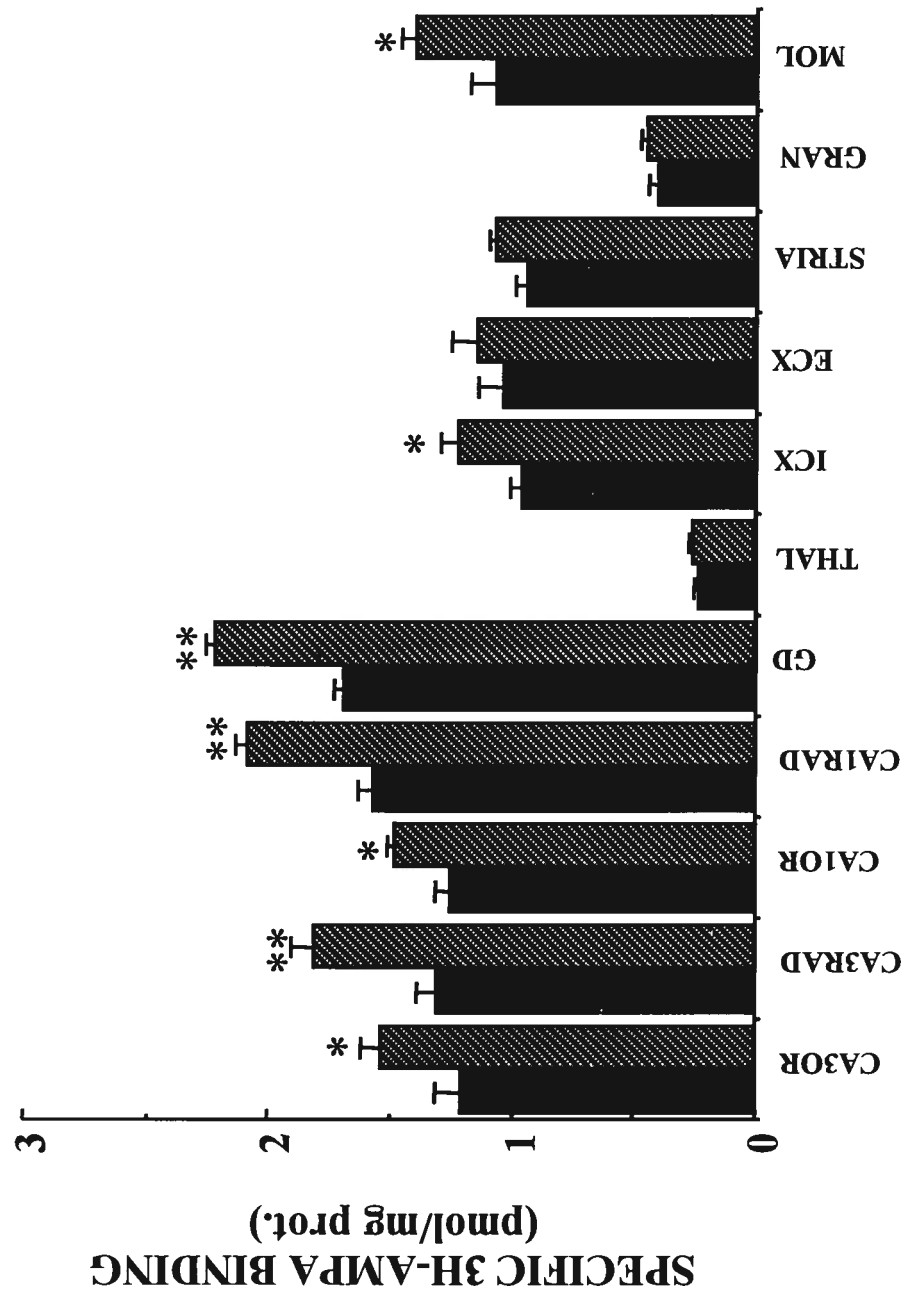
**Fig. 4. Phosphatidylserine-induced increase of 3H-AMPA binding in brain sections of young and aged apoE-deficient mice.** Adjacent horizontal sections prepared from young (A) and aged (B) animals were preincubated at 35°C for 1 hr in Tris-acetate buffer (100 mM, pH 7.4, containing 100 M EGTA) without or with 0.5 mM PS. All autoradiographs were analyzed with a digital analysis system for various hippocampal regions. The results represent PS-induced stimulation of 3H-AMPA binding (expressed as percentage increases over basal binding) in control (black bars) and apoE-deficient sections (striped bars). The data are means  $\pm$  SEM of at least 7–8 different measurements per mouse in 5 different mice. \*Statistical significance compared to basal values. \*P < 0.05 versus controls, Scheffe's test.

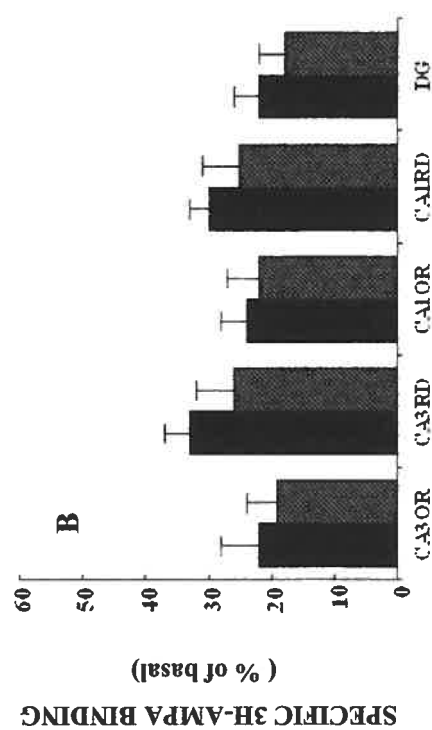
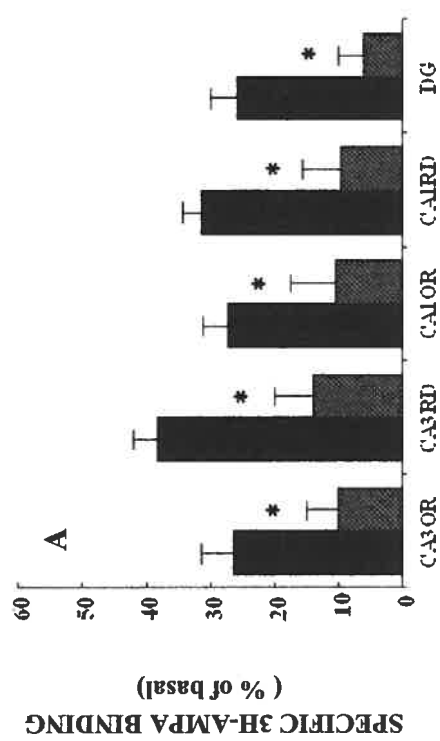
**Fig. 5. LTP in area CA1 of the hippocampus of young and aged apoE-deficient mice.** Field EPSPs were recorded in the stratum radiatum of CA1 pyramidal cells in hippocampal slices prepared from control (closed circles) and apoE-deficient (open circles) animals. In young mice (A), the slope of the response exhibited approximately 80% potentiation in both control and apoE-knockout mice slices after TBS which slowly decayed during the first 10 min. In control slices, the potentiation remained stable with a 55% increase. In young apoE-deficient slices, note the progressive decay in the magnitude of potentiation, resulting in a small 24% increase after TBS. In aged mice (B), no major differences in LTP were detected between slices prepared from control and apoE-deficient animals. The values obtained during the period preceding TBS were averaged to derive baseline values, and each point represents the mean  $\pm$  SEM of 8 different experiments in which the responses of control and apoE-deficient slices were measured before and after TBS.

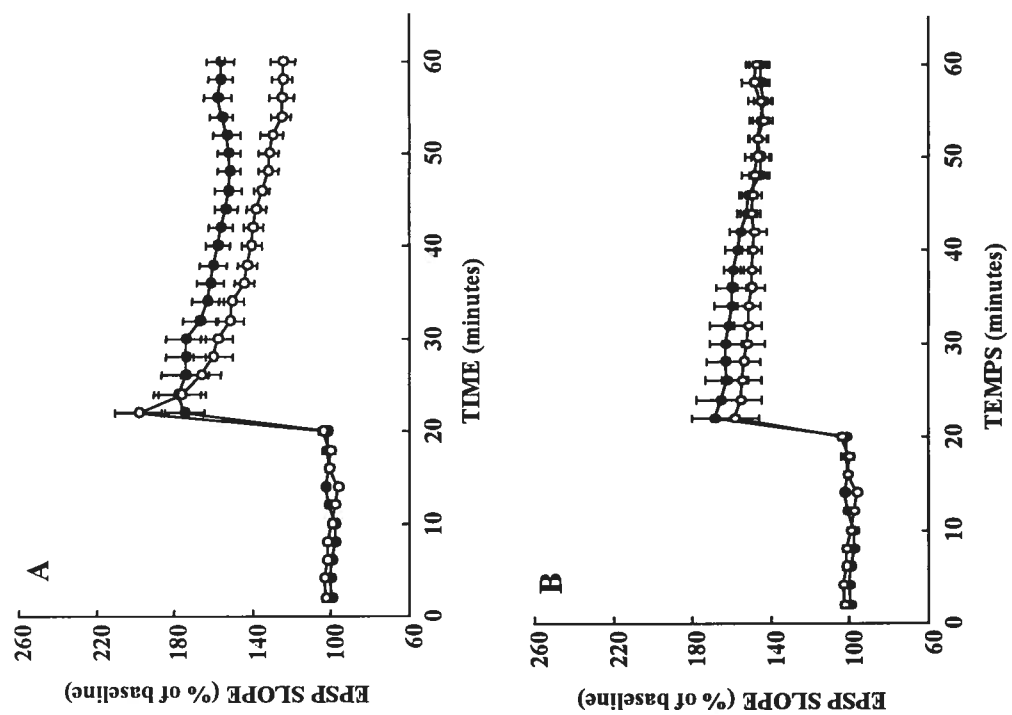
**Table 1. Basal 3H-AMPA binding in different brain structures of young and aged apoE-deficient mice.**













Conditions	Specific $^3\text{H}$ -AMPA binding (pmol/mg protein)						
	CA3OR	CA3RAD	CA1OR	CA1RAD	DG	ICX	STRIA
4-month-old animals							
Control	$1.26 \pm 0.05$	$1.36 \pm 0.05$	$1.40 \pm 0.06$	$1.70 \pm 0.06$	$1.81 \pm 0.04$	$0.98 \pm 0.05$	$0.89 \pm 0.06$
ApoE-KO	$1.21 \pm 0.04$	$1.33 \pm 0.04$	$1.38 \pm 0.09$	$1.81 \pm 0.10$	$1.79 \pm 0.09$	$0.97 \pm 0.06$	$0.85 \pm 0.05$
18-month-old animals							
Control	$1.24 \pm 0.07$	$1.30 \pm 0.07$	$1.46 \pm 0.09$	$1.59 \pm 0.05$	$1.92 \pm 0.13$	$1.09 \pm 0.10$	$0.90 \pm 0.05$
ApoE-KO	$1.22 \pm 0.05$	$1.37 \pm 0.07$	$1.34 \pm 0.07$	$1.70 \pm 0.10$	$1.80 \pm 0.12$	$1.05 \pm 0.10$	$0.97 \pm 0.04$

## **CHAPITRE 2**

### **Deuxième partie**

**POTENTIALISATION À LONG TERME ET  
RÉGULATION DU SYSTÈME GLUTAMATERGIQUE  
CHEZ DES SOURIS PRÉDISPOSÉES  
GÉNÉTIQUEMENT AU DIABÈTE DE TYPE 1**

## **Up-regulation of glutamate receptor is associated with LTP defects at early stages of diabetes mellitus.**

Barbara Valatro<sup>1,2</sup>, Judith Cossette<sup>1</sup>, Nathalie Lavoie<sup>1,2</sup>, Sylvain Gagnon<sup>3</sup>,  
Francois Trudeau<sup>4</sup>, Guy Massicotte<sup>1,2</sup>.

<sup>1</sup>Département de Chimie-Biologie, Université du Québec à Trois-Rivières; <sup>2</sup>Département de Pharmacologie, Université de Montréal;  
<sup>3</sup>Département de psychologie, Université du Québec à Trois-Rivières;  
<sup>4</sup>Département des sciences de l'activité physique, Université du Québec à Trois-Rivières.

Article publié dans  
Diabetologia 2002 Mai 45(5) : 642-50.

## ***Abstract***

**Aims/hypothesis.** Recent studies involving electrophysiology and immunolabelling indicate that short-term insulin treatment of hippocampal neurons in culture induces changes in glutamate receptor function, suggesting that this receptor system can be altered on a relatively rapid time scale during diabetic conditions. To investigate this hypothesis, we examined whether brain glutamate receptors and long-term potentiation are altered in the early stages of diabetes mellitus in non-obese diabetic mice, a genetic model of Type I (insulin-dependent) diabetes mellitus.

**Methods.** In vitro receptor autoradiography and immunoblotting were used to study the impact of diabetes on brain glutamate receptors. From an electrophysiological point of view, field potential recordings were also examined in area CA1 of hippocampal slices to determine the influence of diabetes on long-term potentiation.

**Results.** Quantitative autoradiographic analysis revealed enhanced 3H-glutamate binding to several brain regions of diabetes mice, with maximal increases in the cerebral cortex and hippocampus. Saturation kinetics within the cerebral cortex disclosed that this change of 3H-glutamate was possibly due to an increase in the maximal number of N-methyl-D-aspartate binding sites, an interpretation that was corroborated by Western blot analysis of N-methyl-D-aspartate 2A subunits. Impairment in the expression of hippocampal long-term potentiation was also observed in diabetic mice, while the failure to elicit synaptic potentiation was prevented by insulin treatment.

**Conclusion/interpretation.** Because glutamate receptors are thought to be involved in several degenerative processes, our results suggest that up-regulation of these receptors in the early stages of diabetes could represent an important mechanism underlying neurological complications within the brain of diabetic patients.

**Keywords.** NMDA receptor - AMPA receptor - hippocampus - NOD mice

**Abbreviations.** AMPA  $\alpha$ -Amino-3-hydroxy-5-methylisoxazole-4-propionate; CNQX 6-cyano-7-nitroquinoxaline-2,3-(1H,4H)-dione; fEPSP field excitatory postsynaptic potential; GluR glutamate receptor subunit; HFS high-frequency stimulation; IT insulin treatment; K<sub>d</sub> receptor affinity; LTP long-term potentiation; NMDA N-methyl-D-aspartate; NOD non-obese diabetic mice; NON non-obese non-diabetic mice; NR NMDA receptor subunit.

## ***Introduction***

According to recent projections, over 200 million people worldwide will be diagnosed with diabetes by the year 2010 [1]. Diabetes mellitus is an endocrine disorder of carbohydrate metabolism resulting primarily from inadequate insulin release (Type I insulin-dependent diabetes mellitus) or insulin insensitivity coupled with inadequate compensatory insulin release (Type II non-insulin-dependent diabetes mellitus). Forms of diabetes are associated with the development of complications in the peripheral as well as the central nervous system (CNS). For instance, learning and memory deficits are linked with Type I and Type II diabetes mellitus [2, 3, 4, 5, 6], and brain morphological abnormalities have been found in diabetic patients, mainly in the cortex area [7, 8]. Studies on experimental models of diabetes have provided similar results in that rats with streptozotocin (STZ)-induced diabetes exhibit morphological, behavioural and electrophysiological alterations [9, 10, 11]. In particular, numerous studies strongly suggest that dysfunction in hippocampal long-term potentiation (LTP), in electrophysiological model of synaptic plasticity thought to subserve learning and memory processes, is associated with diabetic conditions [10, 12].

Work over the past decades has shown that regulation of glutamate receptor properties can contribute to learning and memory as well as LTP formation (for review see [13]). Ironically, activation of this neurotransmitter system is also suspected to be involved in neurodegeneration following a wide range of neurological insults, including ischemia, trauma and epileptic seizures [14, 15]. In rodents, N-methyl-D-aspartate (NMDA) and non-NMDA (kainate and  $\alpha$ -amino-3-hydroxy-5-

methyloxazole-4-propionate, AMPA) receptors are two families of ionotropic receptors stimulated by glutamate that have been implicated in neurodegeneration [17]. Overactivation of these receptors can cause cell damage by increasing intracellular calcium concentration in neurons, thereby leading to the generation of free radicals and activation of proteases, phospholipases and endonucleases [18, 19, 20] as well as transcriptional activation of specific cell death programs [21]. Interestingly, evidence from functional and biochemical studies show that long-term exposure to hyperglycaemia in STZ-induced diabetic rats is associated with important glutamate receptor abnormalities [22, 23]. Recently, short-term insulin treatment was found to alter NMDA receptor activation [24] as well as to interact with AMPA receptor trafficking between the plasma membrane and the intracellular compartment in cultured hippocampal neurons [25] indicating that mechanisms underlying diabetic neuropathies could be initiated in the early stages of the disease, as a consequence of abnormal glutamate receptor properties. This is relevant to the clinical situation because excessive activation of glutamate receptors is a characteristic feature of brain damage during stroke and ischemia [26], conditions that are exacerbated by hyperglycaemic states [1]. Using *in vitro* receptor autoradiography as well as immunoblotting, we have explored the possibility that NMDA or AMPA receptor properties are altered in the early stages of diabetes in non-obese diabetic (NOD) mice, a genetic model of Type I (insulin-dependent) diabetes. The functional integrity of the brain was also determined by comparing LTP magnitude in the hippocampus of NOD mice.

## ***Materials and methods***

### **Animals and tissue preparation.**

NOD mice and their controls (non-obese, non-diabetic (NON) mice) were purchased from Jackson Laboratories (Bar Harbor, Me., USA) at 7-9 weeks of age. All mice were kept in individual cages under a 12:12-h light-dark cycle, in a facility that respected proper laboratory principles (NIH publication No. 86-23, revised 1985) and Canadian Council on Animal Care Guidelines. They had access to a standard chow and water ad libitum. In the NOD mouse model, Type I diabetes occurs spontaneously between the 12th and 30th weeks of age, with an onset characterized by polydipsia, glycosuria and hyperglycaemia. In this study, these diabetic mice were either killed by decapitation 1 week after the onset of diabetes, which was established by the presence of glycosuria (Roche Molecular Biochemicals, Laval, Quebec) or treated for 1 week with insulin. A subcutaneous, slow-release implant of stercate insulin was placed under the dorsal skin for 0.1 µg insulin/day of treatment until the mice were killed (LinBit, Linshin Canada, Scarborough, Ontario). Their brains were quickly removed and frozen in isopentane (methyl butane) at -20°C, then stored at -70°C. Horizontal 10- or 30-µm thick sections were cut in a cryostat, thaw-mounted onto chrome-alum-gelatin-coated slides, and stored at -70°C until the day of use. Glucose concentration in serum, from blood samples collected at the time of killing, was determined with a Boehringer Mannheim kit, and found to be in the range of 6-8 mmol/l and 15-19 mmol/l for NON and NOD mice, respectively.



### **Quantitative glutamate receptor autoradiography.**

Adjacent brain sections were pre-incubated at 35°C for 60 min in 12 ml of Tris-acetate buffer (100 mmol/l, pH 7.4) containing 100 µmol/l EGTA (Ethylene glycol-bis(-aminoethyl ether) N,N,N-tetraacetic acid). After washing in 50 ml of Tris-acetate buffer (100 mmol/l, pH 7.4) containing 100 µmol/l EGTA, the sections were processed for AMPA or (6-cyano-7-nitroquinoxaline-2,3-(1H,4H)-dione (CNQX) receptor binding, as described previously [27]. In brief, brain sections were incubated for 45 min at 0-4°C in Tris-acetate buffer (50 mmol/l, pH 7.4; 100 µmol/l EGTA) containing 50 mmol/l potassium thiocyanate and either 30 nmol/l of 3H-AMPA (specific activity 53 Ci mmol<sup>-1</sup>, NEN-Dupont) or 15 nmol/l 3H-CNQX (specific activity 26.70 Ci mmol<sup>-1</sup>, NEN-Dupont). Non-specific binding was defined as binding measured in the presence of 1 mmol/l quisqualate and 5 mmol/l glutamate. At the end of incubation, the sections were rinsed twice in cold incubation buffer for 10 s and once for 5 s in 50% of the same buffer, followed by three dips in distilled water. They were then dried rapidly under a stream of warm air and used for autoradiography. For 3H-glutamate binding to NMDA receptors, sections were incubated with 100 nmol/l of 3H-glutamate (51 Ci mmol<sup>-1</sup>, Mandel Scientific Company, Guelph, Ontario, Canada) for 45 min at 0-4°C in Tris-acetate buffer (50 mmol/l, pH 7.4; 50 µmol/l EGTA) containing 5 µmol/l AMPA, 1 µmol/l kainic acid and 10 µmol/l quisqualate to eliminate glutamate binding to non-NMDA sites, and 100 µmol/l SITS (4-acetanido-4-isothiocyanato-stilbene-2,2-disulfonic acid) to block glutamate uptake sites. Saturation experiments, using concentration from 20 nmol/l to 1 µmol/l, were also done to determine whether the modulation of 3H-glutamate binding was the re-

sult of changes in receptor affinity or in receptor number. Non-specific binding in both types of experiments was defined as binding measured in the presence of 5 mmol/l glutamate. The sections were rinsed twice in incubation buffer for 15 s and once for 10 s in 50% of the same buffer, followed by three dips in distilled water. They were dried as described above for AMPA binding. Dried sections as well as tritium standards (American Radiolabeled Chemicals, St. Louis, Miss., USA) were exposed to tritium-sensitive film (Amersham Hyperfilm, AB, Sweden) for 14 days ( $^3\text{H}$ -AMPA), 12 days ( $^3\text{H}$ -CNQX) or 28 days ( $^3\text{H}$ -glutamate). The films were processed in Sigma developer and fixer. The optical density (OD) of different brain regions was converted to radioactive units, using tritium standards after measurement with an image analysis system (Imaging Research, MCID, St. Catharines, Ontario).

### **Electrophoresis and immunoblotting.**

Horizontal 30- $\mu\text{m}$  sections were cut in a cryostat and thaw-mounted in chrome-alum-gelatin-coated slides. Adjacent sections were preincubated for 60 min in 50 ml of Tris-acetate buffer (100 mmol/l, pH 7.4) containing 100  $\mu\text{mol/l}$  EGTA at 35°C. Tissue was collected in 0.32 mol/l sucrose containing several protease inhibitors (leupeptin 5  $\mu\text{mol/l}$ , phenylmethylsulfonyl fluoride (PMSF) 200  $\mu\text{mol/l}$ , and N-tosyl-L-phenylalanine chloromethyl ketone (TPCK) 1  $\mu\text{g/ml}$ ), then homogenized with a glass-Teflon homogeniser. The homogenates were centrifuged to obtain membrane fractions [28]. Briefly, the homogenates were centrifuged at 1,000 g for 10 min., and the supernatants were centrifuged at 11,500 g for 20 min. The resulting pellet, P2, was defined as the crude synaptosomal fraction. This fraction was resuspended in

Tris-acetate buffer (50 mmol/l, pH 7.4, with the same concentrations of inhibitors as above), and protein concentrations in each fraction were measured by Bio-Rad protein assay (Bio-Rad Laboratories, Mississauga, Ontario). Western blot analysis was conducted on the crude synaptosomal fractions obtained from control and diabetic sections. Aliquots of P2 fractions were subjected to sodium dodecyl sulfate 8% polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) according to the method of Laemmli [29]. Proteins were transferred onto nitrocellulose membranes [30]. To block non-specific sites, the membranes were first incubated for 1 hr at room temperature in phosphate-buffered saline (PBS) containing 5% dry non-fat milk. They were then incubated with primary antibodies against glutamate receptor subunit 1 (GluR1, 0.3  $\mu\text{g/ml}$ ) and GluR2/3 (0.35  $\mu\text{g/ml}$ ) (Upstate Biotechnology, Lake Placid, N.Y., USA) as well as NMDA receptor subunit 1 (NR1, 0.1  $\mu\text{g/ml}$ ) and NR2A (0.1  $\mu\text{g/ml}$ ) (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, Calif., USA) in PBS containing 5% dry non-fat milk. Bands corresponding to GluR1 or 2/3 were detected with an alkaline phosphatase-conjugated secondary antibody (Roche Molecular Biochemicals, Laval, Quebec). The OD of the immunoreactive bands was quantified with a computer imaging system (Imaging Research, MCID, St Catherine, Ontario).

### **Hippocampal slice preparation for electrophysiology.**

Experiments were performed on hippocampal slices [31] prepared from NON, NOD and insulin-treated NOD mice. Transverse slices were maintained at 35°C in medium containing (in mmol/l) NaCl 124, KCl 5,  $\text{Na}_2\text{PO}_4$  1.25,  $\text{MgCl}_2$  1.5,  $\text{CaCl}_2$  2.5,  $\text{NaHCO}_3$  26 and glucose 10. They were exposed to a humidified atmosphere of

95% O<sub>2</sub>: 5% CO<sub>2</sub> and perfused continuously at a flow rate of 1 ml/min. After a 1 h equilibration period, a glass recording electrode (1-5 M; filled with 2 mol/l NaCl) was positioned in the stratum radiatum of area CA1 of the hippocampus to record field excitatory post synaptic potential (fEPSPs) evoked by a bipolar electrode (twisted 60  $\mu$ m nichrome), activating fibres of the Schaffer collateral system. Bipolar stimulating electrodes were placed in the stratum radiatum of two independent pathways converging on common postsynaptic target cells. After a 20-min baseline period during which responses were recorded every 30 sec, theta-burst stimulations (TBS) (10 bursts of 4 stimulation pulses at 100 Hz) were given at 200-msec (5 Hz) intervals. In all cases, the response to stimulation was quantified by calculating the initial slope of the resulting fEPSP.

**Statistical analysis.** In most cases, the data are presented as means  $\pm$  SEM. Between groups, differences in subunit composition were analysed by the two-tailed t test for independent samples. For differences in binding and LTP expression, groups were compared by analysis of variance (ANOVA) followed by Scheffe's post hoc analysis with conventional criteria of statistical significance: p values of less than 0.05.

## **Results**

### **Glutamate receptor binding properties in brain sections of NOD mice.**

Brain sections of NON (glycaemia:  $7.27 \pm 0.9$  mmol/l), NOD (glycaemia:  $17.60 \pm 2.0$  mmol/l) and insulin-treated (IT) NOD ( $10.17 \pm 1.0$  mmol/l) mice were preincubated at 35°C and subjected to quantitative 3H-glutamate ligand binding autoradiography for NMDA receptors. Visual examination of the autoradiographs clearly showed a marked increase of 3H-glutamate binding in the hippocampus and cerebral cortex of NOD mice. The rise in 3H-glutamate binding to NMDA sites observed in diabetic animals was distributed uniformly in the various regions of the hippocampus (Figure 1A). A 18-35% increase in 3H-glutamate binding was found in CA1 and CA3 strata radiatum and oriens as well as in the dentate gyrus of NOD mice, compared to the controls. A moderate increase of about 15% in 3H-glutamate binding to NMDA receptors was seen in the external cortex, and among all the telencephalic regions analysed in diabetic mice, with the internal cortex showing the highest elevation (50%; see Figure 1B), when compared to NON mice. Saturation experiments at equilibrium were performed to determine whether the increment in 3H-glutamate binding in diabetic mice was the result of alterations in receptor affinity or maximal number (Figure 2A). The saturation kinetics of binding in the internal cortex region yielded a linear Scatchard plot, suggesting the existence of a single binding site (Figure 2B). In this brain region, heightened 3H-glutamate binding during diabetes was not due to a change in affinity of NMDA receptors ( $K_d = 206 \pm 33$  nmol/l in

control vs  $K_d = 202 \pm 31$  nmol/l in diabetic sections; means  $\pm$  SEM of 4 experiments), but to a rise in the maximal number of binding sites ( $B_{max} = 2.82 \pm 0.16$  in control vs  $4.23^* \pm 0.23$  pmol/mg of prot. in NOD sections; means  $\pm$  SEM of 6 experiments,  $*p < 0.01$ , Student's *t* test). Ligand binding autoradiography with  $^3H$ -AMPA and  $^3H$ -CNQX was also used to test the effects of diabetes on the binding properties of AMPA receptors in various brain regions. Adjacent brain sections were preincubated at  $35^\circ C$  and then subjected to  $^3H$ -AMPA ligand binding autoradiography. Visual examination of these autoradiographs clearly indicated that the increased  $^3H$ -AMPA binding in various areas of the hippocampus was generated by diabetes. We found a significant increase in around 30% in  $^3H$ -AMPA binding to CA3 and CA1 strata radiatum and oriens of the hippocampus in NOD sections. A similar increase (20-30%) was also observed in the dentate gyrus and cerebral cortex of diabetic mice (Figure 3A, B). As illustrated in Figure 4A, B, quantification and averaging of the data obtained from several sections indicated that no significant changes in  $^3H$ -CNQX binding were generated by diabetes in the various brain regions analysed, compared to NON mice.

### **Expression of NMDA and AMPA receptor subunits in brain sections of NOD mice.**

To evaluate the protein concentrations of glutamate receptors, Western blot analyses were performed on crude synaptosomal fractions obtained from control, diabetic and diabetic-treated mouse sections (30  $\mu m$  thick). Membranes were immunoblotted with antibodies against the C-terminal domains of NR1, NR2A, GluR1

or GluR2/3, as reported previously [32, 33]. Figure 5B shows that NR2A immunostaining was increased in the telencephalic membranes of diabetic compared to control mice. The mean ( $\pm$  SEM) OD values for NR2A ( $0.58 \pm 0.1$  in control vs  $1.15^* \pm 0.03$  in diabetic mice;  $n=5$ ,  $*p<0.01$ ) increased by about 84% in NOD mouse sections, while no changes were reported in NOD mice that received insulin ( $0.69 \pm 0.04$  in control vs  $0.70 \pm 0.04$  in IT NOD). In contrast, Western blot analysis of NR1 ( $0.78 \pm 0.1$  in control vs  $0.91 \pm 0.05$  in diabetic mice) showed no detectable difference in immunostaining between controls and NOD mice. As for NR1, both GluR1 ( $0.48 \pm 0.04$  in control vs  $0.53 \pm 0.05$  in diabetic mice) and GluR2/3 ( $0.35 \pm 0.04$  in control vs  $0.41 \pm 0.05$  in diabetic mice) concentration were similar in control and diabetic mice (Figure 5A).

### **Long-term potentiation (LTP) in diabetic mice before and after insulin treatment.**

Because glutamate receptors contribute to synaptic plasticity in the brain [35, 36], electrophysiological experiments were conducted to examine the influence of diabetes on LTP expression. Hippocampal slices from control, diabetic and insulin-treated diabetic mice were prepared and perfused for 1 h with artificial cerebrospinal fluid (ACSF) before applying high-frequency stimulation (HFS) to the Schaffer commissural pathway in area CA1 of the hippocampus. Theta-burst stimulation (TBS) was used to elicit LTP and consisted of 10 HFS bursts (four pulses at 100 Hz) repeated at 5 Hz. During recording, responses were tested at 30-sec intervals for at least 10 min before TBS and again for at least 40 min after HFS. In the present inves-

tigation, two evoked responses were averaged 1 and 30 min after TBS to determine the possible effect of diabetes on short-term potentiation (STP) and LTP, respectively. As shown in Figure 6, both STP and LTP were reduced in hippocampal slices of NOD mice. Statistical comparisons revealed that LTP magnitude was decreased in diabetic mice ( $24.9\% \pm 6\%$ ;  $n=7$ ,  $p<0.01$ ; Scheffe's test) compared to their controls ( $87.5\% \pm 6\%$ ;  $n=8$ ), while the diminution in the capacity of diabetic slices to generate LTP was markedly prevented by IT ( $61.52\% \pm 6\%$ ;  $n=8$ ).

## ***Discussion***

This study shows that up-regulation of glutamate receptors occurs in the early stages of diabetes mellitus. Binding experiments indicate that the increase in 3H-glutamate binding to NMDA receptors is due to an increase in the maximal number of NMDA-binding sites. Supporting this, we showed that levels of NR2A (but not NR1) are enhanced in crude synaptosomal fractions from NOD mice. There were also indications of enhanced binding affinity of 3H-AMPA for its receptor within the brain of NOD mice, especially in the hippocampal area. In CA1 hippocampal slices, these changes in glutamate receptor properties were associated with LTP impairment and we found that both biochemical and electrophysiological abnormalities were prevented by IT of NOD mice. The effect of diabetes on NMDA receptor binding reported here appears to be variable between brain structures, being larger in the internal layers (III-VI) of the cerebral cortex and almost absent in the striatum. The glutamate-binding site of NMDA receptors seems to be located on NR2, whereas the glycine-binding pocket is on NR1 [17]. Therefore, regional variations of NMDA re-



ceptor binding during diabetes could reflect the differential expression of NR2 in the various brain structures of NOD mice, as indicated by the increase in NR2A (but not NR1) in the telencephalic membranes of NOD mice. Of course, it remains to be seen whether the expression patterns of NR2A are subject to modification in specific cells of the brain regions. In particular, it is known that NR1-NR2A receptor channels are mainly expressed in pyramidal cells, and immunohistochemical studies of brain sections are currently examining whether the expression of NR subunits is differentially regulated by diabetes in these cells. From the functional point of view, experiments done on recombinantly expressed NMDA receptors have revealed that NR2 composition strongly influences the electrophysiological characteristics of NMDA receptor subtypes [17]. NR2A-containing receptor channels differ from other channel subtypes, showing fast deactivation and prominent calcium-dependent desensitisation [34]. Interestingly, NR2A seems to be necessary for LTP formation at several synapses, emphasizing the functional significance of our study revealing up-regulation of NR2A in synaptic membranes from NOD mice [35, 36]. Our finding that NR2A concentrations are increased in synaptic membranes of NOD mice suggests that expression of abnormal NMDA receptors during diabetes could have functional as well as pathological consequences. This contention is supported by the present data indicating that LTP magnitude in area CA1 of hippocampal slices is altered in NOD mice. Of course, this reduction in the capacity of diabetic slices to generate LTP seems to be dependent on the diabetic state, because the LTP defect was prevented by IT of NOD mice. The possible target mechanisms contributing to the impairment in synaptic plasticity, however, remain to be determined but could include promotion of

NMDA-induced cell damage or NMDA-mediated activation of silent synapses in hippocampal neurons [37, 38].

Our study shows that 3H-AMPA binding is enhanced in most brain regions of NOD mice and indicates that the amounts of GluR1 and GluR2/3 are not different in synaptic membranes of NOD mice, suggesting that change in receptor binding is not due to modification of AMPA receptor expression. On the other hand, the characteristic effect, i.e. increased binding of an agonist, 3H-AMPA, and no changes in binding of an antagonist, 3H-CNQX, at AMPA receptors, indicates that diabetes could be associated with alteration in receptor affinity rather than changes in the number of receptors. Indeed, the molecular mechanism responsible for the increased AMPA receptor affinity in NOD mice is not known. Nevertheless, it is noteworthy that activation of the calcium-dependent enzyme phospholipase A<sub>2</sub> (PLA<sub>2</sub>) could be part of the molecular mechanisms underlying changes in AMPA receptor conformation. In particular, it was reported previously that treatment of telencephalic membranes or tissue sections with exogenous PLA<sub>2</sub> or phospholipase C (PLC) heightened AMPA receptor affinity [39, 40, 41, 42]. Various studies have suggested that the effect of phospholipases could be due to modifications of the lipid environment of the receptors, as incorporation of phosphatidylserine (PS) into rat brain membranes reproduced the increased affinity of AMPA receptors elicited by calcium-dependent phospholipases [43]. Therefore, augmented affinity of AMPA receptors in the brain of NOD mice could arise from pre-existing modulation of receptors by endogenous lipases. This notion is, indeed, supported by recent data revealing that PS-induced enhance-

ment of 3H-AMPA binding is reduced in the hippocampus of NOD mice (data not shown).

However, it is important to point out that proteolysis as well as phosphorylation of GluR subunits might also be important for regulating AMPA receptor binding [30, 32]. Thereby, it is possible that up-regulation of AMPA receptor affinity in NOD mice could reflect previous alteration of GluR by proteases or kinases. To the best of our knowledge, no one has directly investigated the properties of glutamate receptors in the brain of spontaneously diabetic animals, but previous works have shown that they can be down-regulated in STZ-treated rats. At the neurochemical level, NMDA receptor expression and phosphorylation were reported to be down-regulated in post-synaptic densities from the brain of chronic STZ-induced diabetic rats [23], and quantitative autoradiographic experiments have revealed that AMPA receptor affinity was reduced in several brain regions [22]. This apparent discrepancy between our results and those of others [22, 23] could be related to the diabetic animal models used. The main difference between the two models (non-genetic STZ and genetic NOD mice) is that the former is chemically induced by a compound (STZ) which is known to possess toxic effects on various tissues, including the brain [44]. In this regard, regulation of glutamate receptors in STZ-treated animals could represent a biochemical response that is not necessarily related to the diabetic state. Moreover, down-regulation of glutamate receptors in STZ-treated rats has only been investigated after a diabetic duration of 3 months, which contrasts with the shorter duration (1 week) used in the course of this study. Therefore, it could be hypothesized that glutamate receptor properties can be differentially modulated, depending on the duration of diabetes [3].

Nevertheless, our data are concordant with a recent study reporting up-regulation of both NMDA and AMPA receptors in thoracic spinal cord sections from obese-diabetic ob/ob mice, another model in which animals develop diabetes spontaneously and which closely resembles the Type II (insulin-independent) condition [45].

Together, the present findings are consistent with the possibility that brain glutamate receptor properties can be modified in diabetic subjects [3]. In particular, our data indicating that up-regulation of glutamate receptors is related to LTP defects in the early stages of diabetes, are in line with the recent observation that early changes in glutamate receptors could be causally involved in the peripheral neuropathies which can accompany diabetes mellitus [45]. Identifying the mechanisms by which these biochemical and electrophysiological changes are exerted could provide important clues about the cellular events responsible for diabetes-induced neuropathies.

**Acknowledgements.** This research was supported by grants from the Natural Sciences and Engineering Research Council (NSERC) of Canada and the Canadian Diabetes Association (CDA) to G. Massicotte and F. Trudeau. B. Valastro is the recipient of a studentship from NSERC and the Quebec Diabetes Association. The authors thank Luc Marchand for his excellent technical assistance and Ovid Da Silva for editing this manuscript.

## References

- 1.Mandrup-Poulsen T (1998) Diabetes. *BMJ* 316: 1221-1225
- 2.Franceschi M, Cecchetto R, Minicucci F, Smizne S, Baio G, Canal N (1984) Cognitive processes in insulin-dependent diabetes. *Diabetes Care* 7: 228-231
- 3.Gispen WH, Biessels GJ (2000) Cognition and synaptic plasticity in diabetes mellitus. *Trends Neurosci* 23: 542-549
- 4.Holmes CS, Hayford JT, Gonzalez JL, Weydert JA (1983) A survey of cognitive functioning at different glucose levels in diabetic persons. *Diabetes Care* 6: 180-185
- 5.Mooradian A, Perryman K, Fitten J, Kavonian G, Morley J (1988) Cortical function in elderly non-insulin dependent diabetic patients: behavioral and electrophysical studies. *Arch Intern Med* 148: 2369-2372
- 6.Perlmutter LC, Tun P, Sizer N, McGlinchey RE, Nathan DM (1987) Age and diabetes related changes in verbal fluency. *Exp Aging Res* 13: 9-14
- 7.Dejgaard A, Gade A, Larsson H, Balle V, Parving A, Parving HH (1991) Evidence for diabetic encephalopathy. *Diabet Med* 8: 162-167
- 8.Reske-Nielsen E, Lundbaek K (1963) Diabetic encephalopathy: diffuse and focal lesions of the brain in long-term diabetes. *Acta Neurol Scand* 39: 273-290
- 9.Jakobsen J, Sidenius P, Gundersen HJG, Osterby R (1987) Quantitative changes of cerebral neocortical structure in insulin-treated long-term streptozotocin-induced diabetes in rats. *Diabetes* 36: 597-601
- 10.Biessels GJ, Kamal A, Ramakers GM et al. (1996) Place learning and hippocampal synaptic plasticity in streptozotocin-induced diabetes rats. *Diabetes* 45: 1259-1267
- 11.Chabot C, Massicotte G, Milot M, Trudeau F, Gagné, J (1997) Impaired modulation of AMPA receptors by calcium-dependent processes in streptozotocin-induced diabetic rats. *Brain Res* 768: 249-256
- 12.Di Mario U, Morrano S, Valle E, Pozzessere G (1995) Electrophysiological alteration of the central nervous system in diabetes mellitus. *Diabetes Metab Rev* 11: 259-277
- 13.Massicotte G (2000) Modification of glutamate receptor by phospholipase A2: its role in adaptive neural plasticity. *Cell Mol Life Sci* 57: 1542-1550

14. Hollmann M, Heinemann S (1994) Cloned glutamate receptors. *Annu Rev Neurosci* 17: 31-108
15. Lipton SA, Rosenberg PA (1994) Excitatory amino acids as a final common pathway for neurologic disorders. *N Engl J Med* 331: 274-275
16. Seeburg PH (1993) The TINS/TIPS Lecture. The molecular biology of mammalian glutamate receptor channels. *Trends Neurosci* 16: 359-365
17. Dingledine R, Borges K, Bowie D, Traynelis SF (1999) The glutamate receptor ion channels. *Pharmacol Rev* 51: 7-61
18. Coyle JT, Puttfarcken P (1993) Oxidative stress, glutamate and neurodegenerative disorders. *Science* 262: 689-695
19. Siesjö BK (1988) Historical overview. Calcium, ischemia, and death of brain cells. *Ann NY Acad Sci* 522: 638-661
20. Siesjö BK, Zhao Q, Phalmark K, Siesjö P, Katsura K, Folbergrova J (1995) Glutamate, calcium, and free radicals as mediators of ischemic brain damage. *Ann Thorac Surg* 59: 1316-1320
21. Schreiber SS, Baudry M (1995) Selective neuronal vulnerability in the hippocampus - a role for gene expression? *Trends Neurosci* 18: 446-451
22. Gagné J, Milot M, Gélinas S et al. (1997) Binding properties of glutamate receptors in streptozotocin-induced diabetes in rats. *Diabetes* 46: 841-846
23. Di Luca M, Ruts L, Gardoni F, Cattabeni F, Biessels GJ, Gispen WH (1999) NMDA receptor subunits are modified transcriptionally and post-translationally in the brain of streptozotocin-diabetic rats. *Diabetologia* 42: 693-701
24. Liu L, Brown JC 3rd, Webster WW, Morrisett RA, Monaghan DT (1995) Insulin potentiates N-methyl-D-aspartate receptor activity in *Xenopus* oocytes and rat hippocampus. *Neurosci Lett* 192: 5-8
25. Man HY, Lin JW, Ju WH et al. (2000) Regulation of AMPA-receptor-mediated synaptic transmission by clathrin-dependent receptor internalization. *Neuron* 25: 649-662
26. McCall AL (1992) The impact of diabetes on the CNS. *Diabetes* 41: 557-570
27. Tocco G, Massicotte G, Standley SS, Thompson RF, Baudry M (1992) Effect of temperature and calcium on the binding properties of the AMPA receptor in frozen rat section. *Eur J Neurosci* 4: 1093-1103

28. Henley JM (1995) Subcellular localisation and molecular pharmacology of distinct population of 3H-AMPA binding sites in rat hippocampus. *Br J Pharmacol* 115: 295-301
29. Laemmli UK (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227: 680-685
30. Towbin H, Staehelin T, Gordon J (1979) Electrophoresis transfer of proteins from polyacrylamide gel to nitrocellulose sheet: procedure and some application. *Proc Natl Acad Sci USA* 76: 4350-4354
31. Lee K, Oliver M, Schottler F, Lynch G (1981) Electron microscopic studies of brain slices: the effects of high frequency stimulation on dendritic ultrastructure. In: Kerkut G, Wheal HV (eds) Academic Press, New York, pp 189-212
32. Bi R, Bi X, Baudry M (1998) Phosphorylation regulates calpain-mediated truncation of glutamate ionotropic receptor. *Brain Res* 797: 154-158
33. Bi X, Chen J, Dang S, Wenthold RJ, Tocco G, Baudry M (1997) Characterization of calpain-mediated proteolysis of GluR1 subunits of alpha-amino-3-hydroxy-5-methylisoxazole-4-propionate receptor in rat brain. *J Neurochem* 68: 1484-1494
34. Medina I, Filippova N, Charton G et al. (1995) Calcium-dependent inactivation of heteromeric NMDA receptor channel expressed in human embryonic kidney cells. *J Physiol* 482: 567-573
35. Sprengel R, Suchanek B, Amico C et al. (1998) Importance of the intracellular domain of NR2 subunits for NMDA receptor function in vitro. *Cell* 92: 279-289
36. Ito I, Futai K, Katagiri H et al. (1997) Synapse-selective impairment of NMDA receptor function in mice lacking NMDA receptor 1 or 2 subunits. *J Physiol* 500: 401-408
37. Michaelis EK (1998) Molecular biology of glutamate receptors in the central nervous system and their role in excitotoxicity, oxidative stress and aging. *Prog Neurobiol* 54: 369-415
38. Dezhi L, Scannevin RH, Huganir R (2001) Activation of silent synapse by rapid activity-dependent synaptic recruitment of AMPA receptors. *J Neurosci* 21: 6008-6017
39. Massicotte G, Baudry M (1990) Modulation of AMPA/quisqualate receptor by phospholipase A2 treatment. *Neurosci Lett* 118: 245-248

40. Massicotte G, Bernard J, Baudry M (1992) Postnatal changes in AMPA receptor regulation by phospholipase A2 inhibitor of synaptic membranes: temporally differential effects on agonist and antagonist binding. *Brain Res Dev Brain Res* 66: 203-208
41. Massicotte G, Vanderklish P, Lynch G, Baudry M (1991) Modulation of AMPA/quisqualate receptors by phospholipase A2: a necessary step in long-term potentiation? *Proc Natl Acad Sci USA* 88: 1893-1897
42. Chabot C, Gagné J, Giguère C, Bernard J, Baudry M, Massicotte G (1998) Bidirectional modulation of AMPA receptor properties by exogenous phospholipase A2 in the hippocampus. *Hippocampus* 8: 299-309
43. Gagné J, Giguère C, Tocco G et al. (1996) Effect of phosphatidylserine on the binding properties of glutamate receptors in brain sections from adult and neonatal rats. *Brain Res* 740: 337-345
44. Mukherjee B, Mukherjee JR, Chatterjee M (1994) Lipid peroxidation, glutathione levels and changes in glutathione-related enzyme activities in streptozotocin-induced diabetic rats. *Immunol Cell Biol* 72: 109-114
45. Li N, Young MM, Bailey CJ, Smith ME (1999) NMDA and AMPA glutamate receptor subtype in the thoracic spinal cord in lean and obese-diabetic ob/ob mice. *Brain Res* 849: 34-44



### **Figure legends**

**Figure 1A, B. NMDA receptor binding in NOD mice.** Adjacent horizontal sections at the level of the hippocampus were preincubated at 35°C for 1 h in Tris-acetate buffer (100 mmol/l, pH 7.4) containing 100  $\mu$ mol/l EGTA. Autoradiographs of 3H-glutamate binding to NMDA receptor, like those shown in the upper part of this figure, were analysed with an image analysis system for the various hippocampal (or, stratum oriens; rad, stratum radiatum; DG, molecular layer of the dentate gyrus) and nonhippocampal (IntCx, inner layers of the parieto-temporal cortex; ExtCx, outer layers of the parieto-temporal cortex; Stria, striatum; Thal, thalamic nuclei) regions. The results obtained for the different regions of control (open bars) and NOD (filled bars) mice sections were expressed in pmol/mg of protein. A, B NMDA receptor binding to hippocampal and nonhippocampal structures, respectively. The data are means  $\pm$  SEM of values obtained from 6 mice with at least 11 different measurements per mouse for each of the cerebral regions examined. \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$  (Scheffe's test), control vs NOD sections.

**Figure 2A, B. Binding properties of NMDA receptors in the cortex formation of NOD mice.** Saturation curve (A) and Scatchard plots (B) of 3H-glutamate binding to NMDA sites in the parieto-temporal cortex of control (open bars) and NOD mice (filled bars) sections. NMDA receptor binding was determined using 3H-glutamate concentrations from 20 nmol/l to 1  $\mu$ mol/l, and non specific binding was defined in the presence of 5 mmol/l of glutamate. The data are presented as Scatchard plots (bound/free) and analysed by the Inplot program from GrafPad to generate  $K_d$  and  $B_{max}$ ; bound values are means  $\pm$  SEM of values obtained with eight different measurements for the cerebral region examined. The saturation binding curve and the saturation plots are representative of experiments done on four different animals.

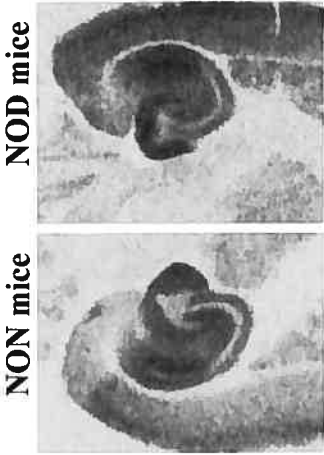
**Figure 3A, B. AMPA receptor binding in NOD mice.** Adjacent horizontal sections at the level of the hippocampus were preincubated at 35°C for 1 h in Tris-acetate

buffer (100 mmol/l, pH 7.4) containing 100  $\mu$ mol/l EGTA. Autoradiographs of 3H-AMPA binding, like those shown in the upper part of this figure, were analysed with an image analysis system for the various hippocampal (A) and non-hippocampal (B) regions. Abbreviations are the same as in Figure 1. The results obtained for the different regions of control (open bars) and NOD (filled bars) mice sections were expressed in pmol/mg of protein. The data are means  $\pm$  SEM of values obtained from 6 mice with at least 11 different measurements per mouse for each of the cerebral regions examined. \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$  (Scheffe's test), control vs NOD sections.

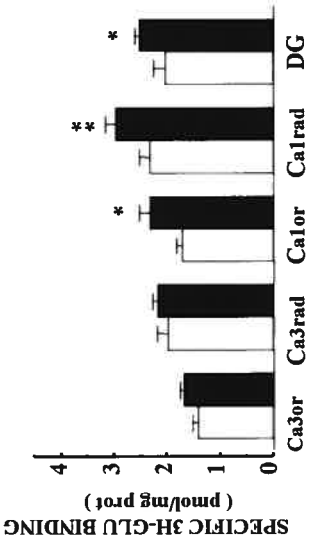
**Figure 4A, B. 3H-CNQX binding in NOD mice.** Adjacent horizontal sections at the level of the hippocampus were preincubated at 35°C for 1 h in Tris-acetate buffer (100 mmol/l, pH 7.4) containing 100  $\mu$ mol/l EGTA. Autoradiographs of 3H-CNQX binding to AMPA receptors were analysed with an image analysis system for the various hippocampal (A) and non-hippocampal (B) regions. Abbreviations are the same as in Figure 1. The results obtained for the different regions of control (open bars) and NOD (closed bars) mice sections were expressed in pmol/mg of protein. The data are means  $\pm$  SEM of values obtained from 6 mice with at least 11 different measurements per mouse for each of the cerebral regions examined. \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$  (Scheffe's test), control vs NOD sections

**Figure 5A, B. Glutamate receptor subunits in NOD mice.** Adjacent horizontal sections from control (open bars) and NOD mice (closed bars) at the level of the dorsal hippocampus were preincubated at 35°C for 1 h in Tris-acetate buffer (100 mmol/l, pH 7.4) containing 100  $\mu$ mol/l EGTA. After incubation, crude synaptosomal (P2) fractions were prepared by subcellular fractionation. Western blots were performed using antibodies against the C-terminal domain of GluR1 and GluR2/3 subunits of AMPA receptors (A) as well as antibodies against the NR1 and NR2A subunits of NMDA receptors (B). Note that NMDA expression is normalized by insulin treatment (IT). A representative Western blot showing modulation of the level of AMPA and NMDA receptor subunits in P2 fractions is presented above the graph. Blots were digitized and the bands were quantified with an image analysis system.

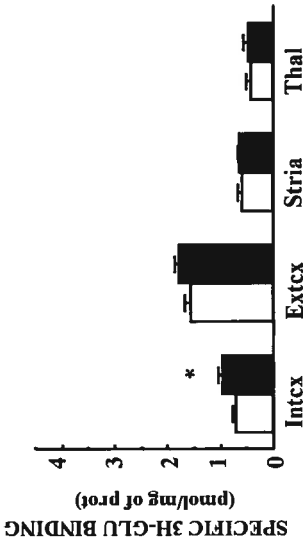
**Figure 6. LTP magnitude in hippocampal slices of NOD mice.** Hippocampal slices were incubated in artificial cerebrospinal fluid (ACSF) and LTP was elicited by high-frequency stimulation (HFS) of the Schaffer collateral system. Evoked fEPSPs were recorded in the stratum radiatum of CA1 pyramidal cells in NON mice (open triangles), NOD mice (open circles) and insulin-treated NOD (open squares) mice. The values obtained during the period preceding TBS were averaged to derive baseline value. The data are expressed as percentages of baseline values and each point represents the mean  $\pm$  SEM of 7-9 different experiments in which the responses were measured before and after HFS.

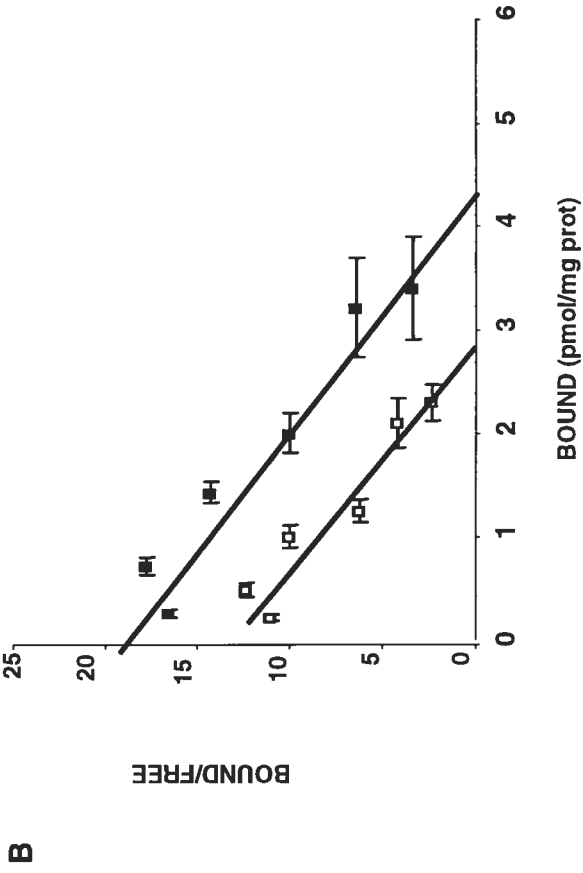
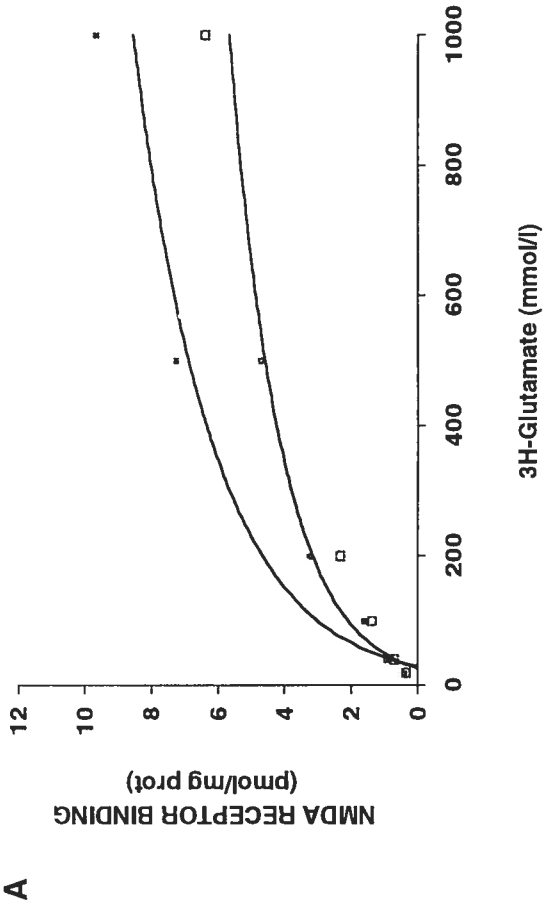


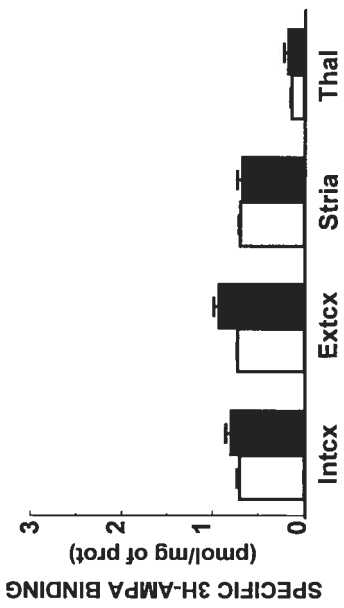
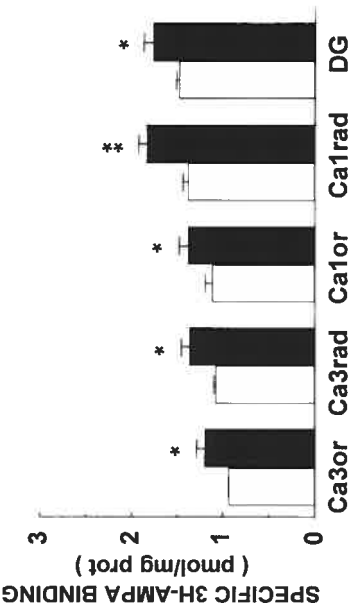
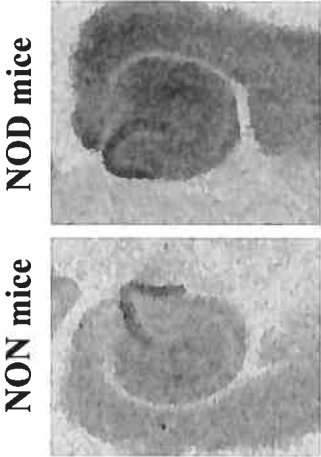
A

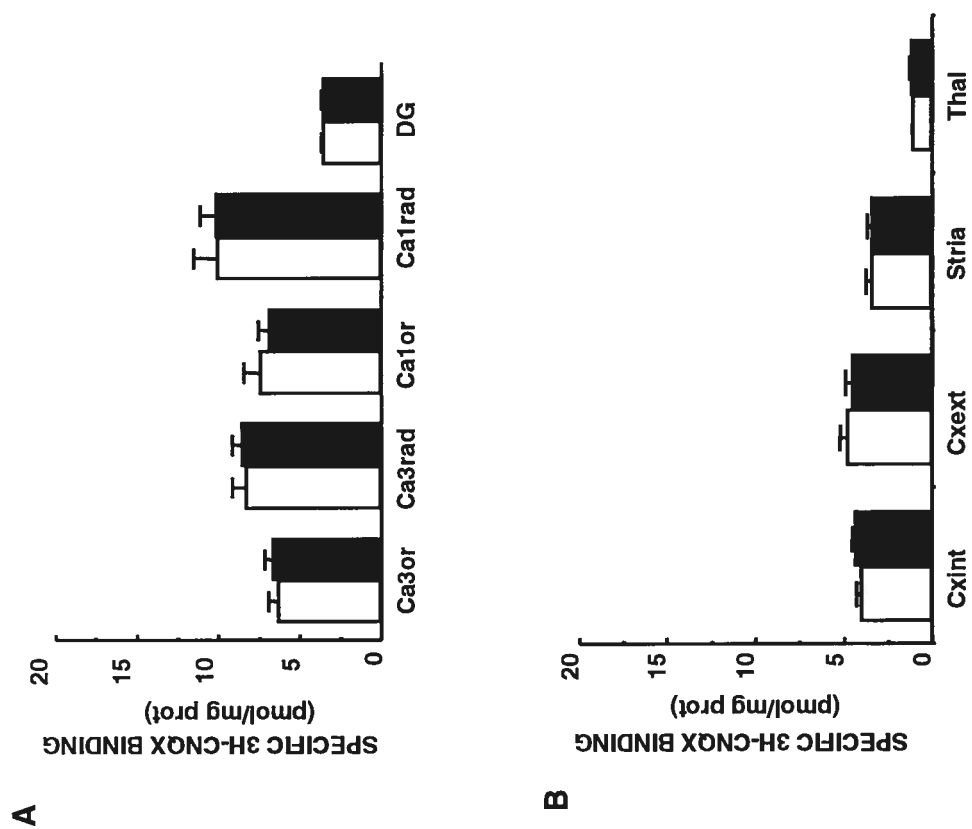


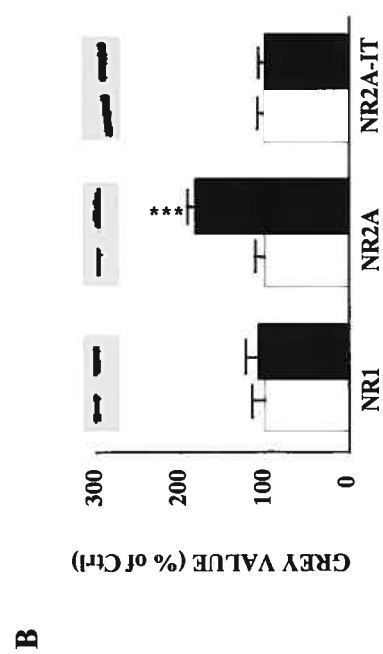
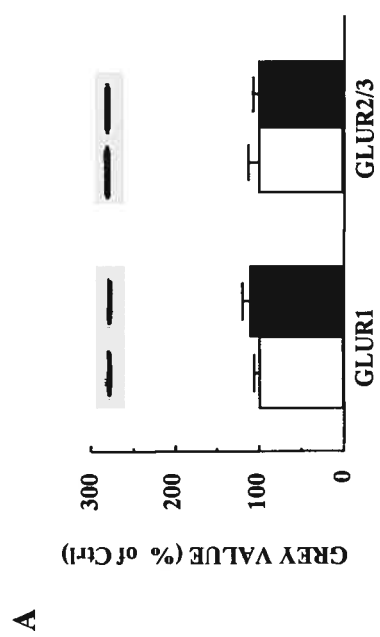
B



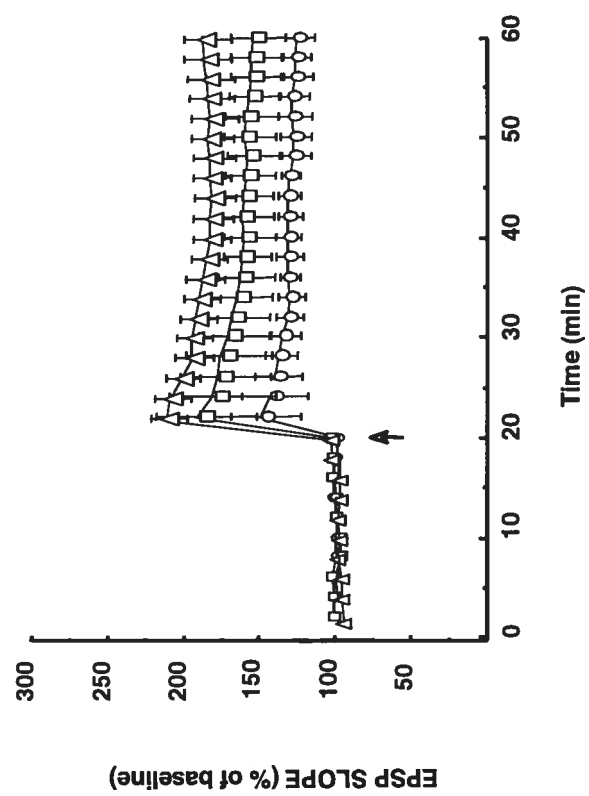












## **CHAPITRE 3**

### **RÉGULATION DES RÉCEPTEURS GLUTAMATERGIQUES PAR L'INOSITOL HEXAKISPHOSPHATE (IP6).**

## **Inositol hexakisphosphate-mediated regulation of glutamate receptor in rat brain sections**

Barbara Valatro<sup>1,2</sup>, Martine Girard<sup>1</sup>, Joël Gagné<sup>1</sup>, Frédéric Martin<sup>1</sup>,  
Angèle T. Parent<sup>3</sup>, Michel Baudry<sup>4</sup>, Guy Massicotte<sup>1,2</sup>.

<sup>1</sup>Département de Chimie-Biologie, Université du Québec à Trois-Rivières; <sup>2</sup>Département de Pharmacologie, Université de Montréal; <sup>3</sup>Department of Neurobiology, Pharmacology and Physiology, University of Chicago; <sup>4</sup>Neuroscience program, University of Southern California.

Article publié dans  
*Hippocampus* 2001, 11: 673–682.

## **Abstract**

D-myo-inositol 1,2,3,4,5,6-hexakisphosphate (InsP6), one of the most abundant inositol phosphates within cells, has been proposed to play a key role in vesicle trafficking and receptor compartmentalization. In the present study, we used in vitro receptor autoradiography, subcellular fractionation, and immunoblotting to investigate its effects on  $\alpha$ -amino-3-hydroxy-5-methylisoxazole-4-propionate (AMPA) and N-methyl-D-aspartate (NMDA) receptors. Qualitative and quantitative analysis of  $^3\text{H}$ -AMPA binding indicated that incubation of frozen-thawed brain sections with InsP6 at 35°C enhanced AMPA receptor binding in several brain regions, with maximal increases in the hippocampus and cerebellum. Moreover, saturation kinetics demonstrated that InsP6-induced augmentation of AMPA binding was due to an increment in the maximal number of AMPA binding sites. At the immunological level, Western blots performed on crude mitochondrial/synaptic (P2) fractions revealed that InsP6 (but not InsP5 and InsP3) treatment increased glutamate receptor (GluR)1 and GluR2 subunits of AMPA receptors, an effect that was associated with concomitant reductions in microsomal (P3) fractions. Interestingly, the InsP6-induced modulation of AMPA receptor binding was blocked at room temperature and pretreatment with heparin also dampened its action on both AMPA receptor binding and GluR subunits. These effects of InsP6 appear to be specific to AMPA receptors, as neither  $^3\text{H}$ -glutamate binding to NMDA receptors nor levels of NR1 and NR2A subunits in P2 and P3 fractions were affected. Taken together, our data strongly suggest that InsP6 specifically regulates AMPA receptor distribution, possibly through a clathrin-dependent process.

**KEY WORDS:** inositol phosphate; phytic acid; AMPA receptor; NMDA receptor; adaptin; clathrin

**Abbreviations:** AP, adaptor protein; AMPA, (RS)- $\alpha$ -amino-3-hydroxy-5-methylisoxazole-propionate; DPGA, 2,3-diphospho-D-glyceric acid; GluR, glutamate receptor; IGF II, insulin-like growth factor receptor II; InsPs, inositol phosphates; InsP3, D-myo-inositol 1,4,5-trisphosphate; InsP5, Dmyo-inositol 1,3,4,5,6-pentakisphosphate; InsP6, D-myo-inositol 1,2,3,4,5,6-hexakisphosphate; InsS6, D-myo-inositol 1,2,3,4,5,6-hexakisulfate; LTP, long-term potentiation; NMDA, N-methyl-D-aspartate; OD, optical density; PBS, phosphate-buffered saline; PMSF, phenylmethylsulfonyl fluoride; PSD, postsynaptic density; SITS, 4-acetanido-4-isothiocyanato-stilbene-2,2-disulfonic acid; TPCK, N-tosyl-L-phenylalanine chloromethyl ketone.

## ***Introduction***

D-myo-inositol 1,2,3,4,5,6-hexakisphosphate (InsP6), one of the most abundant inositol phosphates, is formed via complex pathways of inositol phosphate metabolism. In some cell types, its concentration is rapidly altered upon cell stimulation (Sasakawa et al., 1993, 1995), and experimental evidence indicates that it is involved in the control of several cellular functions. For instance, InsP6 has been shown to reduce light-induced desensitization of rhodopsin (Palczewski et al., 1992), presumably through direct binding to arrestin (Palczewski et al., 1991), a specialized class of regulatory proteins. In the brain, a number of high-affinity binding sites for InsP6 have been found (Hawkins et al., 1990; Nicoletti et al., 1990; Theibert et al., 1991, 1992), and one of them has been identified as the C2B domain of synaptotagmin (Fukuda et al., 1994), a major calcium-sensor for regulating exocytosis in neurons. InsP6 also binds with high affinity to clathrin assembly proteins, the adaptor proteins (AP)-2 and AP-3 (Beek and Keen, 1991; Theibert et al., 1992; Timerman et al., 1992; Voglmaier et al., 1992), thereby inhibiting clathrin assembly (Beek and Keen, 1991; Norris et al., 1995; Ye et al., 1995). In fact, InsP6 has been proposed to participate in vesicle trafficking and receptor compartmentalization (Sasakawa et al., 1995), and the demonstration that microinjection of InsP6 into cells can inhibit vesicle trafficking is consistent with the involvement of an inositide-binding site in this process (Llina's et al., 1994). The concept was also recently strengthened by the observation that increased InsP6 in response to G protein-coupled receptor signals blocks the recruitment of AP-2 and clathrin-dependent endocytosis of Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase activity in renal

epithelial cells (Ogimito et al., 2000). Glutamate receptors (GluRs), which are major excitatory receptors within the central nervous system, are the object of particular attention, since their regulation appears to be crucial for controlling synaptic function. For instance, GluRs have been proposed to control fast excitatory neurotransmission at glutamatergic synapses, and their excessive activation has been demonstrated to be potentially neurotoxic (Seeburg, 1993; Hollmann and Heinemann, 1994; Lipton and Rosenberg, 1994). N-methyl-D-aspartate (NMDA) and non-NMDA (kainate and  $\alpha$ -amino-3-hydroxy-5-methylisoxazole-propionate; AMPA) receptors are two families of ionotropic receptors activated by glutamate (Dingledine et al., 1999). Among several important functions, the NMDA receptor has been implicated in the induction of long-term potentiation (LTP), an electrophysiological model of learning and memory (Bliss and Collingridge, 1993). However, alterations in AMPA receptors appear to be primarily responsible for the enhanced synaptic current observed during expression of LTP (Kauer et al., 1988; Muller and Lynch, 1988; Davies et al., 1989). In this context, studies have shown that LTP expression may involve the uncovering of functional AMPA receptors in hippocampal slices that, prior to LTP, were either not present in postsynaptic membranes or were electrophysiologically silent (Isaac et al., 1995; Liao et al., 1995). Consistently, recent reports have proposed that regulation in the surface expression of AMPA receptors at individual synapses may contribute to the changes in synaptic strength that occur during LTP (Shi et al., 1999; Hayashi et al., 2000). Although the detailed molecular mechanisms by which AMPA receptors are regulated during synaptic plasticity remain intensely debated, it was suggested recently that the surface expression of these receptors might undergo endocytosis

through a clathrin-dependent process (Man et al., 2000; Wang and Linden, 2000). It was also reported that GluR2 subunits coimmunoprecipitate with adaptor protein 2 (AP-2) (Man et al., 2000), indicating that inositol lipids could play a role in the regulation of AMPA receptors. Here, we used in vitro receptor autoradiography, subcellular fractionation, and immunoblotting to study the effect of InsP6 on both AMPA and NMDA receptors. Our results suggest that InsP6 treatment of rat brain sections selectively regulates the subcellular distribution of AMPA receptors.



## ***Materials and methods***

### **Tissue preparation and chemicals**

Male Sprague-Dawley rats (Anilab, Inc., St. Foy, Quebec, Canada) were kept in a temperature- and humidity-controlled environment and exposed to a 12-h light/12-h dark cycle, with standard rat chow and water ad libitum. The animals were housed in a facility that met Canadian Council of Animal Care guidelines. For binding studies, 4-month-old rats were sacrificed by decapitation after methoxyflurane anaesthesia. Their brains were quickly removed and frozen in isopentane (methyl butane) at  $-20^{\circ}\text{C}$ , and then kept at  $-70^{\circ}\text{C}$ . Frontal or horizontal  $10\text{-}\mu\text{m}$ -thick sections were cut in a cryostat, thaw-mounted onto chrome-alum gelatine coated slides, and stored at  $-70^{\circ}\text{C}$  until the day of use. 2,3-diphospho-D-glyceric acid (DPGA), D-myo-inositol 1,4,5-trisphosphate (InsP3), D-myo-inositol 1,3,4,5,6-pentakisphosphate (InsP5), D-myo-inositol 1,2,3,4,5,6-hexakisulfate (InsS6), and InsP6 were all obtained from Sigma (St. Louis, MO).

### **Quantitative glutamate receptor autoradiography**

Adjacent sections were preincubated at  $35^{\circ}\text{C}$  for 60 min in 50 ml of Tris-acetate buffer (100 mM, pH 7.4) containing 100  $\mu\text{M}$  EGTA with and without InsP6 (or other compounds). In some experiments, preincubation with InsP6 was also performed in the presence of heparin (2.0 U/ml). After washing in 50 ml of Tris-acetate buffer (100 mM, pH 7.4) containing 100  $\mu\text{M}$  EGTA, the sections were processed for AMPA receptor binding, as described previously (Tocco et al., 1992). In brief, sec-

tions were incubated for 45 min at 0–4°C in Tris-acetate buffer (50 mM, pH 7.4; 100  $\mu$ M EGTA) containing 50 mM potassium thiocyanate and 75 nM 3H-AMPA (specific activity 53 Ci mmol<sup>-1</sup>, NEN-Dupont, Wilmington, DE). Nonspecific binding was defined as binding measured in the presence of 1 mM quisqualate. At the end of incubation, the sections were rinsed twice in cold incubation buffer for 10 s and once for 5 s in 50% of the same buffer, followed by three dips in distilled water. They were rapidly either wiped off the slides with GF/C filters and filter radioactivity was counted in a liquid scintillation counter, or dried under a stream of warm air and used for autoradiography. Saturation kinetics were performed at various concentrations of 3H-AMPA (20 nM to 6  $\mu$ M) in area CA1 of the hippocampus, and the autoradiographs were analyzed by the Inplot program from GrafPad to generate K<sub>d</sub> and B<sub>max</sub> values. For 3H-glutamate binding to NMDA receptors, sections were incubated with 100 nM of 3H-glutamate (51 Ci mmol<sup>-1</sup>, NEN-Dupont) for 45 min at 0–4°C in Tris-acetate buffer (50 mM, pH 7.4; 50  $\mu$ M EGTA) containing 5  $\mu$ M AMPA, 1  $\mu$ M kainic acid, and 10  $\mu$ M quisqualate to eliminate glutamate binding to non-NMDA sites, and 100  $\mu$ M SITS (4-acetanido-4-isothiocyanatostilbene-2,2-disulfonic acid) to block glutamate uptake sites. Nonspecific binding was defined as binding measured in the presence of 1 mM glutamate. The sections were rinsed twice in incubation buffer for 15 s and once for 5 s in 50% of the same buffer, followed by three dips in distilled water. They were dried as described above for AMPA binding. Dried sections as well as tritium standards (ARC, St. Louis, MO) were exposed to tritium-sensitive film (Amersham Hyperfilm) for 7 days (3H-AMPA) or 14 days (3H-glutamate). The films were processed in Sigma developer and fixer. The optical densities of different brain

regions were converted to radioactive units, using tritium standards after measurement with an image analysis system (Imaging Research, MCID, St.Catherines, Ontario, Canada). ANOVA was followed by Scheffe's post hoc analysis with the conventional criterion for statistical significance.

### **Electrophoresis and immunoblotting**

Horizontal 30- $\mu$ m sections were cut in a cryostat and thaw mounted in chrome-alum gelatine-coated slides. Adjacent sections were preincubated for 60 min in 50 ml of Tris-acetate buffer (100 mM, pH 7.4) containing 100  $\mu$ M EGTA at 35°C with or without 200  $\mu$ M InsP6. Tissue was collected in 0.32 M sucrose containing several protease inhibitors (leupeptin 5  $\mu$ M, phenylmethylsulfonyl fluoride (PMSF) 200  $\mu$ M, and N-tosyl-L-phenylalanine chloromethylketone (TCPK) 1  $\mu$ g/ml), and homogenized with a glass-Teflon homogenizer. The homogenates were centrifuged to obtain crude mitochondrial/synaptic (P2) and microsomal (P3) membrane fractions (Henley, 1995). Briefly, homogenates were centrifuged at 1,000g for 10 min, and the supernatants were centrifuged at 11,500g for 20 min. The resulting pellet, P2, was defined as the synaptosomal fraction. The pellet P3, obtained by supernatant centrifugation at 100,000g for 1h, was defined as the microsomal fraction. The P2 and P3 fractions were resuspended in Tris-acetate buffer (50 mM, pH7.4, with the same concentrations of inhibitors as above), and protein concentrations in each fraction were measured by Bio-Rad protein assay. In some experiments, Triton X-100 extraction of crude synaptic membrane fractions was performed to isolate postsynaptic densities (PSDs). Aliquots of P2 fractions (about 100  $\mu$ g proteins) were treated with 1ml of

Triton extraction buffer (1% Triton X-100, 40 mM Tris, 150 mM NaCl, 1 mM EDTA, 50  $\mu$ M leupeptin, 100  $\mu$ M PMSF, and 2  $\mu$ g/ml aprotinin, pH 7.4) on ice for 15 min with intermittent vortexing. The extraction was centrifuged at 16,000g for 20 min, and the resulting pellet was defined as the Triton-insoluble fraction. Western blot analysis was conducted on membrane fractions obtained from control and InsP6-treated sections. Aliquots of P2 and P3 fractions were subjected to SDS-PAGE (8% polyacrylamide), according to the method of Laemmli (1970). Proteins were transferred onto nitrocellulose membranes, as described previously (Towbin et al., 1979). To block nonspecific sites, the membranes were first incubated for 1 h at room temperature in phosphate-buffered saline (PBS) containing 5% dry non-fat milk. The membranes were incubated with primary antibodies against GluR1 (0.5  $\mu$ g/ml) or GluR2 (0.5  $\mu$ g/ml) (Upstate Biotechnology, Lake Placid, NY) in PBS containing 5% dry non-fat milk. Bands corresponding to GluR1 or 2 were detected with an alkaline phosphatase-conjugated secondary antibody (Roche Molecular Biochemicals). The optical density (OD) of the immunoreactive bands was quantified with a computer imaging system (Imaging Research). Here again, ANOVA was followed by Scheffe's post hoc analysis with the conventional criterion for statistical significance.

## Results

### InsP6-induced changes in GluR binding in rat brain sections

We first assessed the effects of incubating rat brain sections with increasing InsP6 concentrations on the binding properties of AMPA receptors. Horizontal sections were preincubated in Tris-acetate buffer in the presence of various InsP6 concentrations (1–300  $\mu$ M), and 3H-AMPA binding was then measured by wiping off the sections to evaluate the amount of specifically bound radioactivity. InsP6 produced a dose-dependent increase of specific 3H-AMPA binding in these rat brain sections, with a maximal elevation of about 50% above control values at 100  $\mu$ M InsP6 (solid circles, Fig. 1A). Its effect was temperature-dependent, as it was markedly reduced at room temperature (22°C; open circles, Figure 1A). At a concentration of 200  $\mu$ M, InsP6 caused a  $50 \pm 4\%$  increase of specific 3H-AMPA binding in sections preincubated at 35°C, while it had no action in sections preincubated at room temperature ( $4 \pm 4\%$ ;  $n = 6$ ,  $P = 0.05$ , Student's *t*-test). Brain sections were next preincubated with 200  $\mu$ M InsP6 and subjected to quantitative 3H-AMPA ligand binding autoradiography. Visual examination of autoradiography clearly showed a marked increase of 3H-AMPA binding in the hippocampus, cerebellum, and other brain structures after InsP6 treatment (Fig. 1B). The rise in 3H-AMPA binding elicited by InsP6 preincubation was distributed uniformly in the various regions of the hippocampus (Fig. 1C). InsP6 produced a 20–30% augmentation of 3H-AMPA binding in CA1 and CA3 strata radiatum and oriens as well as in the dentate gyrus. It also elicited a moderate increase of about 15% in 3H-AMPA binding in the internal cortex and, among all the

regions analyzed, the cerebellum showed the highest elevation (88%; see Fig. 1D). Saturation experiments at equilibrium were performed to determine whether the increase in 3H-AMPA binding elicited by InsP6 was the result of alterations in receptor affinity or maximal number. The saturation kinetics of binding in the strata radiatum of the CA1 region yielded a linear Scatchard plot, suggesting the existence of a single binding site (Fig. 2). In this region, the InsP6-induced increase in 3H-AMPA binding was not due to a change in affinity of AMPA receptors ( $K_d = 145 \pm 26$  nM in control vs.  $K_d = 158 \pm 14$  nM in InsP6-treated sections; means  $\pm$  SEM of six experiments), but to a rise in the maximal number of sites ( $B_{max} = 7.5 \pm 0.34$  in control vs.  $11.6^* \pm 0.3$  pmol/mg of protein in InsP6-treated sections; means  $\pm$  SEM of six experiments,  $P < 0.01$ , Student's *t*-test). It should be mentioned that, in the present study, we failed to detect any high-affinity sites (Fig. 2). This was probably due to the preincubation of sections at 35°C; high-affinity AMPA-binding sites have been shown to represent cytoplasmic receptors, and to be easily washed out by preincubation of tissue sections at 35°C (Standley et al., 1998). Ligand-binding autoradiography with 3H-glutamate was also used to test the effects of InsP6 on the binding properties of NMDA receptors in various brain regions (Fig. 3A). As illustrated in Figure 3B,C, quantification and averaging of the data obtained from several sections indicated that no significant changes in 3H-glutamate binding were produced by InsP6 treatment in the various brain regions analyzed. Of course, these results suggest that changes in AMPA receptors are not the result of a chemical artefact of tissue preparation.

### Subcellular localization of GluR subunits after InsP6 treatment of rat brain sections

Frozen-thawed brain sections (30  $\mu$ m thick) were incubated at 35°C in the presence and absence of 200  $\mu$ M InsP6 for 60 min. After preincubation, they were homogenized and subjected to subcellular fractionation. Samples from crude mitochondrial/synaptic (P2) and microsomal (P3) fractions were immunoblotted with antibodies against the C-terminal domains of GluR1 or GluR2, as reported previously (Bi et al., 1997, 1998). Figure 4A shows that incubation of rat brain sections with InsP6 resulted in an increase of 105-kDa species of GluR1 and GluR2 subunits in the mitochondrial/synaptic (P2) fraction. The mean ( $\pm$  SEM) OD values for both GluR1 ( $0.64 \pm 0.05$  in control vs.  $0.84 \pm 0.06$  in InsP6-treated sections;  $n = 8$ ,  $P = 0.01$ ) and GluR2 ( $0.47 \pm 0.05$  in control vs.  $0.61 \pm 0.05$  in InsP6-treated sections;  $n = 8$ ,  $P = 0.01$ ) subunits were elevated by about 30% after InsP6 treatment of rat brain sections. However, while the levels of these two subunits were enhanced in the P2 fraction, they were reduced (also by about 30%) in the microsomal (P3) fraction (Fig. 4A). It should be mentioned that, in homogenates containing both P2 and P3 fractions, we failed to detect any changes in GluR1 subunits after InsP6 treatment ( $0.52 \pm 0.06$  in control vs.  $0.55 \pm 0.04$  in InsP6-treated sections;  $n = 4$ ), reinforcing the notion that apparent increases in GluR subunits observed in P2 fractions are due to corresponding reductions in P3 fractions. Another set of experiments was conducted using anti-NR1 and anti-NR2A antibodies to test whether NMDA receptors were affected by InsP6 treatment of rat brain sections. Consistent with the binding experiments, no significant differences in the intensity of NR1 or NR2A staining were detected in mitochondrial/synaptic as well as microsomal fractions prepared from con-

trol and InsP6-treated sections (Fig. 4B). The cellular mechanisms for the regulation of AMPA receptor properties by InsP6 remain to be understood. InsP6 is known to interact with adaptor proteins in the brain, and InsP6 binding has been demonstrated to be inhibited by heparin (Theibert et al., 1991). Therefore, we examined the effect of heparin on InsP6-induced modulation of AMPA receptor properties. Preincubation of horizontal sections with heparin (2 U/ml) significantly reduced the InsP6-mediated increase of 3H-AMPA binding (Fig. 5A). In addition, heparin prevented the InsP6-induced elevation of GluR1 subunits of AMPA receptors in synaptic membranes (Fig. 5B). The effect of InsP6 on GluR1 subunits was also abolished by pretreatment of rat sections with a hypertonic medium (350 mM glucose) and was not reproduced by a similar concentration of InsS6 that binds with low affinity to clathrin adaptor protein, suggesting that it requires clathrin-dependent processes (see Fig. 6A). We also examined the effects of InsP6 treatment of rat brain sections on Triton X-100 solubility of GluR1 subunits in crude synaptic membrane (P2) preparations. In agreement with previous reports (Wentholt et al., 1996; Lu et al., 1999), levels of Triton X-100-insoluble GluR1 subunits represented about 20% of those occurring in P2 fractions (Fig. 5C). Triton-insoluble AMPA receptors possibly represent receptors incorporated in PSDs, as the pattern of proteins observed with comassie blue staining of Triton-insoluble fractions was very similar to that reported by others using standard PSD preparation procedures, with clear identification of spectrin, actin, and CaMKII (data not shown). InsP6-induced elevation of GluR1 subunit levels was also observed in Triton-insoluble fractions (Fig. 5C), suggesting that InsP6 plays a role in regulating AMPA receptors at PSDs.



### **Effects of other inositol phosphates on AMPA receptors**

It might be argued that InsPs produced by InsP6 dephosphorylation during the preincubation period can account for the observed modulation of AMPA receptors by InsP6. Therefore, we examined the effect of several InsPs (InsP5, InsP3, and DPGA) on GluR1 subunit levels in P2 fractions. As shown in Figure 6, Western blotting experiments indicated a dose-dependent increase of GluR1 immunoreactivity in P2 fractions, with a maximal augmentation to about 40% of control values at 200  $\mu$ M InsP6. This effect of InsP6 on GluR1 appeared to be relatively specific, since it was not reproduced by InsS6 and other phosphate compounds such as InsP5, InsP3, and DPGA. In fact, our immunoblot experiments revealed that both InsP5 and InsP3 are capable of reducing GluR1 immunoreactivity in P2 fractions (Fig. 6), suggesting that AMPA receptors can be differentially regulated by InsPs.

## ***Discussion***

In this study, we determined the effects of InsP6 treatment of frozen-thawed rat brain sections on AMPA and NMDA receptors. Western blot and ligand-binding analysis revealed that InsP6 treatment of brain sections selectively modulated AMPA receptor properties. In particular, InsP6 produced an increase in the levels of GluR1 and GluR2 subunits of AMPA receptors in crude mitochondrial/synaptic (P2) fractions prepared from rat brain sections. In contrast, the amounts of these subunits were reduced in microsomal (P3) fractions, suggesting that AMPA receptor distribution between intracellular and plasma membrane compartments was altered by InsP6 treatment. Quantitative autoradiography of  $^3\text{H}$ -AMPA binding similarly revealed that InsP6 treatment enhanced  $^3\text{H}$ -AMPA binding sites in several regions, although modulation of AMPA binding appeared to be different in various brain structures. Whether regional differences in the effects of InsP6 are due to heterogeneity of AMPA receptors or to regional variations in the ability of tissues to generate the InsP6 effect is not clear. Nevertheless, the observation that AMPA receptor modulation by InsP6 was maximal in the hippocampus and cerebellum is entirely consistent with the distribution of InsP6 binding sites in these brain regions (Hawkins et al., 1990; Parent and Quirion, 1994), raising the possibility that endogenous InsP6 plays an important role in the regulation of AMPA receptors. There are relatively few studies on the regulation of surface receptors by InsP6. With regard to the present investigation, Kar et al. (1994) reported an interaction between InsP6 and insulin-like growth factor receptor II (IGF II) in rat brain sections. InsP6 also reduced light-induced desensitization of rhodopsin (Palczewski et al., 1992), presumably through direct binding to arrestin

(Palczewski et al., 1991), suggesting that InsP6 participates in the control of G-protein-coupled receptors. In agreement with his prediction, agonist-induced desensitization of substance P receptors was blocked by InsP6 in *Xenopus* oocytes (Sasakawa et al., 1994). AMPA receptors, originally identified as classical ionotropic receptors, were recently found to exhibit metabotropic activity. In particular, AMPA-receptor stimulation reduced both pertussis toxin induced ADP ribosylation of G $\alpha$ i1 and forskolin-induced cAMP elevation in cultured cortical neurons and membrane preparations (Wang et al., 1997). Interestingly, G $\alpha$ i1 coimmunoprecipitated with GluR1 in AMPA-treated cultures but not in control cultures, suggesting the involvement of ionotropic AMPA receptors in metabotropic signaling cascades. The mechanism of interaction between AMPA receptors and G proteins is still unclear, although an AP might be involved. One indication that this idea might be true is the recent observation that GluR2 subunits coimmunoprecipitated with AP (Man et al., 2000). The recognized interaction of InsP6 with AP-2 calls attention to the possibility that InsP6 might contribute to the regulation of AMPA receptor levels in synaptic membranes. It is well-recognized that AP-2 binds to the cytoplasmic tail of a number of membrane receptors and is involved in the internalization of neurotransmitter receptors. In particular, AP-2 is known to interact with receptors for IGF II and to mediate the endocytosis of IGF II as well as other signaling peptides, such as transforming growth factor  $\beta$  (Glickman et al., 1989; Kar et al., 1994). Once recruited to the inner surface of the plasma membrane, AP-2 is likely to initiate the formation of clathrin-coated pits by triggering the assembly of clathrin triskelion subunits into a polygonal lattice that causes bending of the membrane into the coated pit structure (Heuser and Keen,

1988; Mahaffey et al., 1990). Clathrin-coated pits detach from the plasma membrane by a GTP-dependent fission reaction mediated by the GTPase dynamin, and the resulting coated membrane vesicles become internalized (Koenig and Ikeda, 1989). InsP6, by interacting with AP-2, inhibits clathrin assembly and vesicle trafficking, suggesting its influence on receptor compartmentalization (Sasakawa et al., 1995). In the present investigation, the levels of some GluR subunits were increased in crude mitochondrial/synaptic (P2) fractions and decreased in microsomal (P3) fractions following InsP6 treatment. As predicted, heparin was found to block the InsP6-induced change of AMPA receptor compartmentalization, suggesting that InsP6 modulation of AMPA receptors is due to an interaction with APs. The present results, together with recent works revealing that intracellular AMPA receptors are colocalized with EPS15 and AP-2 (two components of clathrin-coated pits), support the contention that AMPA receptors might undergo internalization into clathrin-coated vesicles (Carroll et al., 1999; Man et al., 2000; Wang and Linden, 2000). A putative biochemical model that accounts for the control of AMPA receptors by InsP6 is represented in Figure 7. It should be noted that this model assumes that internalization of AMPA receptors takes place in rat brain sections in the absence of an exogenous source of energy. Further studies are needed to verify this assumption. Our results clearly indicate that the changes produced by InsP6 on the AMPA subtype of glutamate receptors are not due to chemical artifact, as InsP6 treatment did not modify either <sup>3</sup>H-glutamate binding to NMDA receptors or the levels of NR1 and NR2A subunits in either P2 or P3 fractions. These data are in good agreement with previous studies showing that, while NMDA receptors are not modified by various biochemi-

cal and physiological manipulations, AMPA receptors are easily altered under such conditions. For instance, pretreatment of telencephalic membranes with certain calcium-dependent phospholipases selectively enhanced agonist binding to AMPA but not NMDA receptors (Massicotte and Baudry, 1990; Massicotte et al., 1990). The reasons for such differences in behaviour of AMPA and NMDA receptors after InsP6 treatment are presently unknown. Different subunit compositions and/or an association of receptors with synaptic or cytoskeletal proteins might explain the selective action of InsP6. In this regard, it is noteworthy that intracellular proteins, such as glutamate receptor interacting protein and N-ethylmaleimide-sensitive fusion protein, were recently identified as AMPA receptor-interacting proteins (Lin and Sheng, 1998; Nishimune et al., 1998). We need to determine whether InsP6 treatment has any effect on the interactions of AMPA receptor subunits with any of these proteins. The ability of InsP6 to modulate AMPA receptor properties might greatly facilitate elucidation of the molecular mechanisms responsible for activity-dependent regulation of AMPA receptor-targeting synapses and synaptic membranes. It is now established that experimental manipulations of neuronal activity can cause redistribution of AMPA receptors toward or away from synaptic sites (Lissin et al., 1998; Carrol et al., 1999). The present biochemical observations are consistent with the notion of a rapid cycling of AMPA receptors in and out of postsynaptic membranes (Luscher et al., 1999; Shi et al., 1999) and with the demonstration that these receptors might be regulated by dynamin-dependent endocytosis (Carroll et al., 1999). On the other hand, a role for InsP6 in regulating AMPA-receptor internalization is consistent with studies on synaptic plasticity that have indicated that membrane fusion events (Lledo et al.,

1998), insertion of functional AMPA receptors (Isaac et al., 1995; Liao et al., 1995), and 3H-AMPA binding (Maren et al., 1993) are modulated during LTP. The fact that InsP6 levels can be rapidly modified in cultured cerebellar granule cells upon depolarization with high potassium (Sasakawa et al., 1993) strongly suggests that neuronal activity and InsP6-induced modulation of AMPA receptor number at postsynaptic membranes might be interrelated. This is an intriguing possibility that warrants further investigation. Our results underscore that AMPA-receptor distribution in neurons might be under the control of InsP6 production. Of course, the functional significance of this modulation remains unknown; further experiments on the interactions of AMPA receptors with InsP6 should provide interesting information on the control of synaptic operation. In particular, additional experiments remain to be performed to establish whether the observed action of InsP6 can also be exerted during ligand-mediated endocytosis of AMPA receptors in neurons. Of course, future work will also include elucidation of the mechanisms and functional significance underlying changes in AMPA receptor properties generated by other InsPs, such as InsP5 and InsP3.

**Acknowledgments:** this research was supported by a grant from the Natural Sciences and Engineering Research Council (NSERC) of Canada to G.M. B.V. is the recipient of a Studentship from NSERC. The authors thank Luc Marchand for his excellent technical assistance and Ovid Da Silva for editing this manuscript.

## References

- Beek KA, Keen JH. 1991. Self-association of the plasma membrane-associated clathrin assembly protein AP-2. *J Biol Chem* 266:4437–4441.
- Bi X, Chen J, Dang S, Wenthold RJ, Tocco G, Baudry M. 1997. Characterization of calpain-mediated proteolysis of GluR1 subunits of alpha-amino-3-hydroxy-5-methylisoxazole-4-propionate receptors in rat brain. *J Neurochem* 68:1484–1494.
- Bi R, Bi X, Baudry M. 1998. Phosphorylation regulates calpain-mediated truncation of glutamate ionotropic receptors. *Brain Res* 797:154–158.
- Bliss TV, Collingridge GL. 1993. A synaptic model of memory: long-term potentiation in the hippocampus. *Nature* 361:31–39.
- Carroll RC, Lissin DV, von Zastrow M, Nicoll RA, Malenka RC. 1999. Rapid redistribution of glutamate receptors contributes to long-term depression in hippocampal cultures. *Nat Neurosci* 2:454–460.
- Davies SN, Lester RA, Reymann KG, Collingridge GL. 1989. Temporally distinct pre- and post-synaptic mechanisms maintain long-term potentiation. *Nature* 338:500–503.
- Dingledine R, Borges K, Bowie D, Traynelis SF. 1999. The glutamate receptor ion channels. *Pharmacol Rev* 51:7–61.
- Fukada M, Aruga J, Niinobe M, Aimoto S, Mikoshiba K. 1994. Inositol-1,3,4,5-tetrakisphosphate binding to C2B domain of IP4BP/synaptotagmin II. *J Biol Chem* 269:29206–29211.
- Glickman JN, Conibear E, Pearse BMF. 1989. Specificity of binding of clathrin adaptors to signals on the mannose-6-phosphate/insulin-like growth factor II. *EMBO J* 8:1041–1047.
- Hawkins PT, Reynolds DJM, Poyner DR, Hanley MR. 1990. Identification of a novel inositol phosphate recognition site: specific 3H-inositol hexakisphosphate binding to brain regions and cerebellar membranes. *Biochem Biophys Res Commun* 167:819–827.
- Hayashi Y, Shi SH, Esteban JA, Piccini A, Poncer JC, Malinow R. 2000. Driving AMPA receptors into synapses by LTP and CaMKII: requirement for GluR1 and PDZ domain interaction. *Science* 287:2262–2267.
- Henley JM. 1995. Subcellular localization and molecular pharmacology of distinct populations of 3H-AMPA binding sites in rat hippocampus. *Br J Pharmacol* 115:295–301.

Heuser JE, Keen J. 1988. Deep-etch visualization of proteins involved in clathrin assembly. *J Cell Biol* 107:877–886.

Hollmann M, Heinemann S. 1994. Cloned glutamate receptors. *Annu Rev Neurosci* 17:31–108.

Isaac JTR, Nicoll RA, Malenka RC. 1995. Evidence for silent synapses: implications for the expression of LTP. *Neuron* 15:427–434.

Kar S, Quirion R, Parent A. 1994. An interaction between inositol hexakisphosphate (IP<sub>6</sub>) and insulin-like growth factor II receptor binding sites in the rat brain. *Neuroreport* 5:625–628.

Kauer JA, Malenka RC, Nicoll RA. 1988. A persistent postsynaptic modification mediates long-term potentiation in the hippocampus. *Neuron* 1:911–917.

Koenig JH, Ikeda K. 1989. Disappearance and reformation of synaptic vesicle membrane upon transmitter release observed under reversible blockade of membrane retrieval. *J Neurosci* 9:3844–3860.

Laemmli UK. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227:680–685.

Liao D, Hessler NA, Malinow R. 1995. Activation of postsynaptically silent synapses during pairing-induced LTP in CA1 region of hippocampal slice. *Nature* 375:400–404.

Lin JW, Sheng M. 1998. NSF and AMPA receptors get physical. *Neuron* 21:267–270.

Lipton SA, Rosenberg PA. 1994. Excitatory amino acids as a final common pathway for neurologic disorders. *N Engl J Med* 330:613–622.

Lissin DV, Gomperts SN, Carroll RC, Christine CW, Kalman D, Kitamura M, Hardy S, Nicoll RA, Malenka RC. 1998. Activity differentially regulates the surface expression of synaptic AMPA and NMDA glutamate receptors. *Proc Natl Acad Sci USA* 95:7097–7102.

Lledo PM, Zhang X, Südhof TC, Malenka RC, Nicoll RA. 1998. Postsynaptic membrane fusion and long-term potentiation. *Science* 279:399–403.

Llinàs R, Sugimori M, Lang EJ, Morita M, Fukuda M, Niinobe M, Mikoshiba K. 1994. The inositol high-polyphosphate series blocks synaptic transmission by preventing vesicular fusion: a squid giant synapse study. *Proc Natl Acad Sci USA* 91:12990–12993.



Lu XY, Rong YQ, Bi RF, Baudry M. 1999. Calpain-mediated truncation of rat brain AMPA receptors increases their Triton X-100 solubility. *Brain Res* 863:143–150.

Luscher C, Xia HH, Beattie EC, Carroll RC, von Zastrow M, Malenka RC, Nicoll RA. 1999. Role of AMPA receptor cycling in synaptic transmission and plasticity. *Neuron* 24:649–658.

Mahaffey DT, Peeler JS, Brodsky FM, Anderson RGM. 1990. Clathrin coated pits contain an integral membrane protein that binds the AP-2 subunit with high affinity. *J Biol Chem* 265:16514–16520.

Man HE, Lin JW, Ju WH, Ahmadian G, Liu L, Becker LE, Sheng M, Wang YT. 2000. Regulation of AMPA receptor-mediated synaptic transmission by clathrin-dependent receptor internalization. *Neuron* 25:649–662.

Maren S, Tocco G, Standley S, Baudry M, Thompson RF. 1993. Postsynaptic factors in the expression of long-term potentiation (LTP): increased glutamate receptor binding following LTP induction in vivo. *Proc Natl Acad Sci USA* 90:9654–9658.

Massicotte G, Baudry M. 1990. Modulation of AMPA/quisqualate receptors by phospholipase A2 treatment. *Neurosci Lett* 118:245–248.

Massicotte G, Kessler M, Lynch G, Baudry M. 1990. N-methyl-D-aspartate and quisqualate/AMPA receptors: differential regulation by phospholipase C treatment. *Mol Pharmacol* 32:278–285.

Muller D, Lynch G. 1988. Long-term potentiation differentially affects two components of synaptic responses in hippocampus. *Proc Natl Acad Sci USA* 85:9346–9350.

Nicoletti F, Bruno V, Cavallaro S, Copani A, Sortino MA, Canonico PL. 1990. Specific binding sites for inositol hexakisphosphate in brain and anterior pituitary. *Mol Pharmacol* 37:689–673.

Nishimune A, Isaac JTR, Molnar E, Noel J, Nash SR, Tagaya M, Collingridge GL, Nakanishi S, Henley JM. 1998. NSF binding to GluR2 regulates synaptic transmission. *Neuron* 21:87–97.

Norris FA, Ungewickell E, Majerus PW. 1995. Inositol hexakisphosphate binds to clathrin assembly protein 3 (AP-3/AP180) and inhibits clathrin cage assembly in vitro. *J Biol Chem* 270:214–217.

Ogimito G, Yudowski GA, Barker CJ, Köhler M, Katz AI, Féraille E, Pedemonte CH, Berggren P-O, Bertorello AM. 2000. G protein-coupled receptors regulate

Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase activity and endocytosis by modulating the recruitment of adaptor protein 2 and clathrin. *Proc Natl Acad Sci USA* 97:3242–3247.

Palczewski K, Pulvermuller A, Buczylo J, Gutmann C, Hofmann KP. 1991. Binding of inositol phosphates to arrestin. *FEBS Lett* 295:195–199.

Palczewski K, Rispoli G, Detwiler PB. 1992. The influence of arrestin (48K protein) and rhodopsin kinase on visual transduction. *Neuron* 8:117–126.

Parent A, Quirion R. 1994. Differential localization and pH dependency of phosphoinositide 1,4,5-IP<sub>3</sub>, 1,3,4,5-IP<sub>4</sub> and IP<sub>6</sub> receptors in rat and human brains. *Eur J Neurosci* 6:67–74.

Sasakawa N, Nakaki T, Kakinuma E, Kato R. 1993. Increase in inositol tris-, pentakis- and hexakisphosphate by high K<sup>+</sup> stimulation in cultured rat cerebellar granule cells. *Brain Res* 623:155–160.

Sasakawa N, Ferguson JE, Sharif M, Hanley MR. 1994. Attenuation of agonist-induced desensitization of the rat substance P receptor by microinjection of inositol penta and hexakisphosphate in *Xenopus laevis* oocytes. *Mol Pharmacol* 46:380–385.

Sasakawa N, Sharif M, Hanley MR. 1995. Metabolism and biological activities of inositol pentakisphosphate and inositol hexakisphosphate. *Biochem Pharmacol* 50:137–146.

Seeburg PH. 1993. The molecular biology of mammalian glutamate receptors channels. *Trends Neurosci* 16:359–365.

Shi SH, Hayashi Y, Petralia RS, Zaman SH, Wenthold RJ, Svoboda K, Malinow R. 1999. Rapid spine delivery and redistribution of AMPA receptors after synaptic NMDA receptor activation. *Science* 284:1811–1816.

Standley S, Georges T, Naveed W, Baudry M. 1998. High- and low affinity alpha-[<sup>3</sup>H] amino-3-hydroxy-5-methylisoxazole-4-propionic acid ([<sup>3</sup>H] AMPA) binding sites represent immature and mature forms of AMPA receptors and are composed of differentially glycosylated subunits. *J Neurochem* 70:2434–2445.

Theibert AB, Estevez VA, Ferris CD, Danoff SK, Barrow RK, Prestwich GD, Snyder SH. 1991. Inositol 1,3,4,5-tetrakisphosphate and inositol hexakisphosphate receptor proteins: isolation and characterization from rat brain. *Proc Natl Acad Sci USA* 88:3165–169.

Theibert AB, Estevez VA, Mourey RJ, Marecek JF, Barrow RK, Prestwich GD, Snyder SH. 1992. Photoaffinity labeling and characterization of isolated inositol 1,3,4,5-tetrakisphosphate- and inositol hexakisphosphate-binding proteins. *J Biol Chem* 267:9071–9079.

Timerman AP, Mayrleitner MM, Lukas TJ, Chadwick CC, Saito A, Watterson DM, Schindler H, Fleischer S. 1992. Inositol polyphosphate receptor and clathrin assembly protein AP-2 are related proteins that form potassium-selective ion channels in planar lipid bilayers. *Proc Natl Acad Sci USA* 89:8976–8980.

Tocco G, Massicotte G, Standley S, Thompson RF, Baudry M. 1992. Effect of temperature and calcium on the binding properties of the AMPA receptor in frozen rat brain sections. *Eur J Neurosci* 4:1093–1103.

Towbin H, Staehelin T, Gordon J. 1979. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheet: procedure and some applications. *Proc Natl Acad Sci USA* 76:4350–4354.

Voglmaier SM, Keen JH, Murphy JE, Ferris CD, Prestwich GD, Snyder SH, Theibert AB. 1992. Inositol hexakisphosphate receptor identified as the clathrin assembly protein AP-2. *Biochem Biophys Res Commun* 187:158–163.

Wang YT, Linden DJ. 2000. Expression of cerebellar long-term depression requires postsynaptic clathrin-mediated endocytosis. *Neuron* 25: 635–647.

Wang YT, Small DL, Stanimirovic DB, Morley P, Durkin JP. 1997. AMPA receptor-mediated regulation of a Gi-protein in cortical neurons. *Nature* 389:502–504.

Wentholt RJ, Petralia RS, Blahos J II, Niedzielski AS. 1996. Evidence for multiple AMPA receptor complexes in hippocampal CA1/CA2 neurons. *J Neurosci* 16:1982–1989.

Ye W, Ali N, Bembenek ME, Shears SB, Lafer EM. 1995. Inhibition of clathrin assembly by high affinity binding of specific inositol polyphosphates to the synapse specific clathrin assembly protein AP-3. *J Biol Chem* 270:1564–1568.

### Figure legends

**FIGURE 1. Modulation of AMPA receptor binding by InsP6.** A: Adjacent horizontal sections at the level of the dorsal hippocampus were preincubated at 35°C (solid circles) or 22°C (open circles) for 1 h with increasing concentrations (1–300  $\mu$ M) of InsP6. The results represent InsP6-induced modulation of 3H-AMPA binding and are expressed as percent of basal binding determined in sections preincubated with buffer alone. The data are means  $\pm$  SEM of values obtained from at least 5 rats with three different measurements per rat. B: Computer-generated images of autoradiograms of 3H-AMPA binding in rat brain sections preincubated at 35°C for 1 h in the absence or presence of 200  $\mu$ M InsP6. C: Autoradiographs like those shown in B were analyzed with an image analysis system for the various hippocampal regions (OR, stratum oriens; RAD, stratum radiatum; DG, molecular layer of the dentate gyrus). The results obtained for the different regions of control (open bars) and InsP6-treated (200  $\mu$ M; solid bars) sections are expressed in pmol/mg of protein. D: Same as C, but representing 3H-AMPA binding to nonhippocampal structures (CTX, inner layers III–VI of the parieto-temporal cortex; STRIA, striatum; MOL, molecular layer of the cerebellum; GRAN, granular layer of the cerebellum; THAL, thalamic nuclei). The data are means  $\pm$  SEM of values obtained from at least 6 rats with at least eight different measurements per rat for each of the cerebral regions examined. \* $P$  < 0.05, \*\* $P$  < 0.01 (Scheffe's test).

**FIGURE 2. Effect of InsP6 on binding properties of AMPA receptors in the hippocampus formation.** Scatchard plots of 3H-AMPA binding in the stratum radiatum of the CA1 region of sections preincubated without (open squares) and with (solid squares) 200  $\mu$ M InsP6. 3H-AMPA binding was determined using concentrations from 20 nM to 6  $\mu$ M, and autoradiography was performed as described in Materials and Methods. The data are presented as Scatchard plots (B/F, bound/free) and are analyzed by the Inplot program from Graf-Pad to generate  $K_d$  and  $B_{max}$ ; Scatchard plots are the results of experiments performed in 5 different animals.

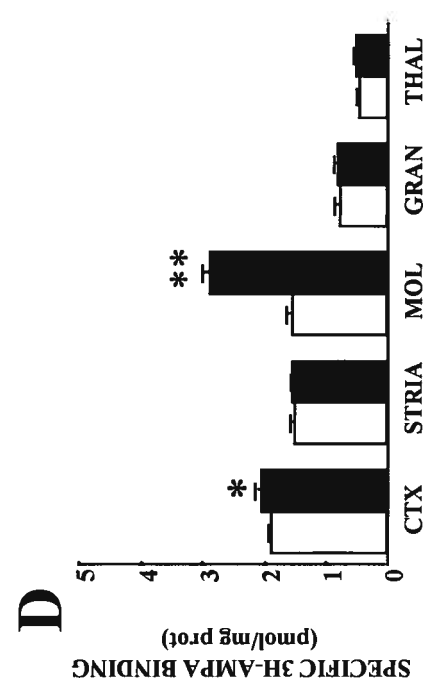
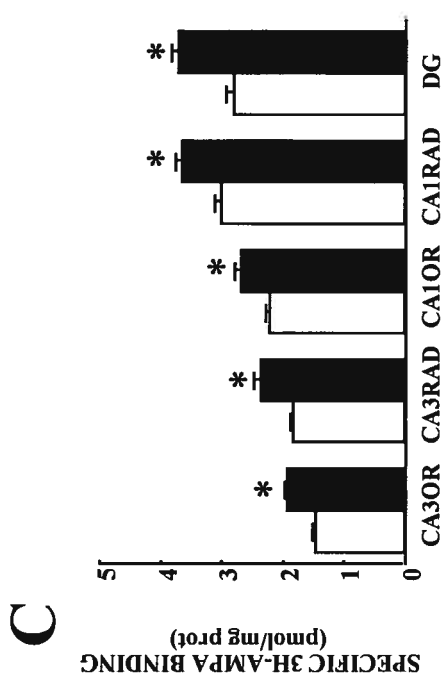
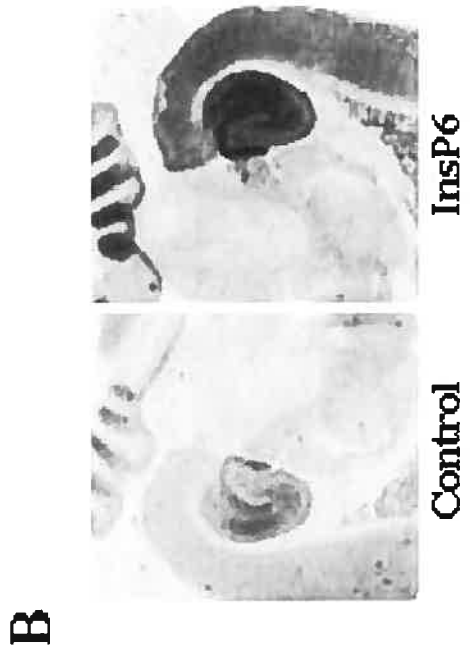
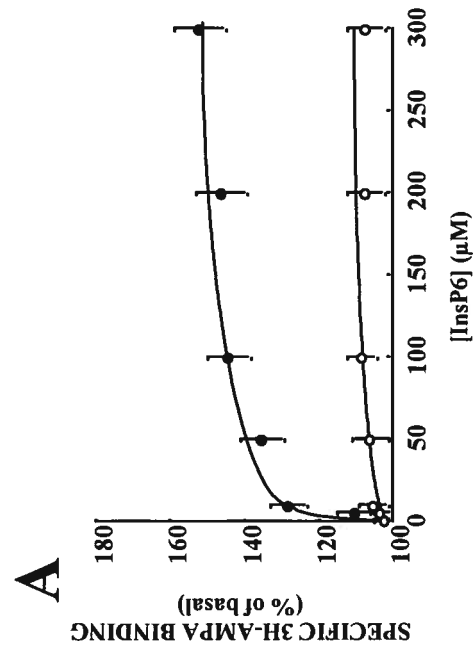
**FIGURE 3. Effect of InsP6 on NMDA receptor binding.** A: Computer-generated images of autoradiograms of  $^3\text{H}$ -glutamate binding to NMDA receptor sites in rat brain sections preincubated at  $35^\circ\text{C}$  for 1 h in the absence or presence of  $200\ \mu\text{M}$  InsP6. B: Autoradiographs like those shown in A were analyzed with an image analysis system for the various hippocampal regions (OR, stratum oriens; RAD, stratum radiatum; DG, molecular layer of dentate gyrus). The results obtained for the different regions of control (open bars) and InsP6-treated ( $200\ \mu\text{M}$ ; solid bars) sections are expressed in pmol/mg of protein. C: Same as B but represent  $^3\text{H}$ -glutamate binding to nonhippocampal structures (CTX, inner layers III–VI of the parieto-temporal cortex; STRIA, striatum; MOL, molecular layer of the cerebellum; GRAN, granular layer of the cerebellum; THAL, thalamic nuclei). The data are means  $\pm$  SEM of values obtained from at least 6 rats with at least eight different measurements per rat for each of the cerebral regions examined.

**FIGURE 4. Effect of InsP6 treatment on subcellular localization of glutamate receptor subunits.** A: Adjacent horizontal sections at the level of the dorsal hippocampus were preincubated at  $35^\circ\text{C}$  for 1 h in the absence (open bars) or presence (solid bars) of  $200\ \mu\text{M}$  InsP6. After incubation, mitochondrial/synaptic (P2) and microsomal (P3) fractions were prepared by subcellular fractionation. Western blots were performed using antibodies against the C-terminal domain of GluR1 and GluR2 subunits of AMPA receptors. Blots were digitized, and the intensity of the 105-kDa bands was quantified (grey values). Representative Western blots showing InsP6-induced modulation of the levels of AMPA receptor subunits in both P2 and P3 fractions are presented above the graph. B: Same as A for NR1 and NR2A subunits of NMDA receptors. Results are expressed as percent of control values and represent the means  $\pm$  SEM of 6–8 experiments.  $*P < 0.05$ , compared with control values (Scheffe's test).

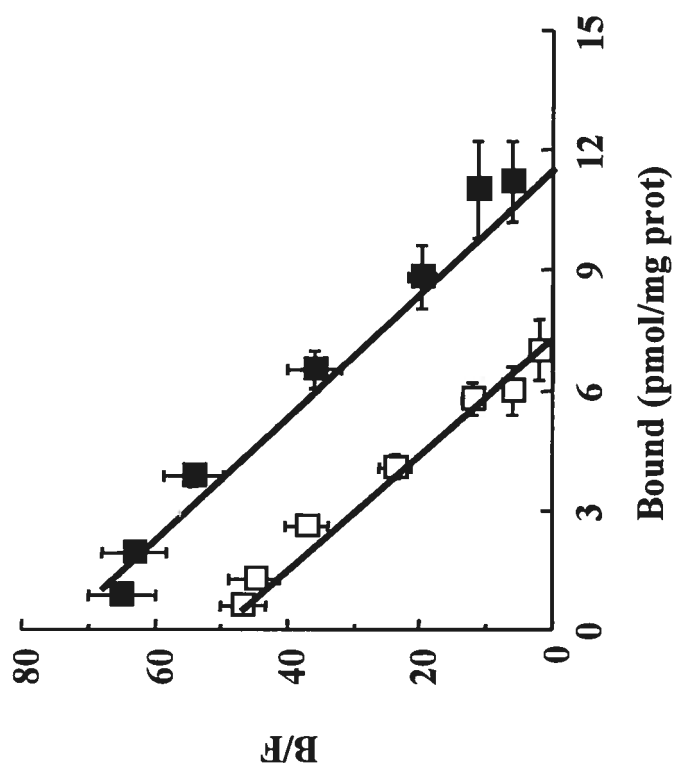
**FIGURE 5. Effect of heparin and Triton X-100 on InsP6-induced modulation of AMPA receptors.** A: Adjacent horizontal sections at the level of the dorsal hippocampus were preincubated at 35°C for 1 h with 2 U/ml heparin in the absence (open bars) or presence (solid bars) of 200  $\mu$ M InsP6. <sup>3</sup>H-AMPA binding to whole sections was determined, as described in Materials and Methods. Results are expressed as percent of basal binding in control sections. Data are means  $\pm$  SEM of values obtained from 5 rats. B: Same as A for the GluR1 subunits of AMPA receptors. Mitochondrial/synaptic (P2) fractions of rat brain sections were prepared by subcellular fractionation, and Western blots were performed using antibodies against the C-terminal domain of GluR1 subunits. Results are expressed as percent of control values and represent means  $\pm$  SEM of six experiments. C: Adjacent horizontal sections at the level of the dorsal hippocampus were preincubated at 35°C for 1 h in the absence (open bars) or presence (solid bars) of 200  $\mu$ M InsP6. After incubation, mitochondrial/synaptic (P2) fractions were prepared by subcellular fractionation and subjected to Triton X-100 extraction. Western blots were performed using antibodies against the C-terminal domain of GluR1 subunits. Results are expressed as percent of control values found in P2 control fractions and represent the means  $\pm$  SEM of five experiments.  $**P < 0.01$ , compared with control values (Scheffe's test).

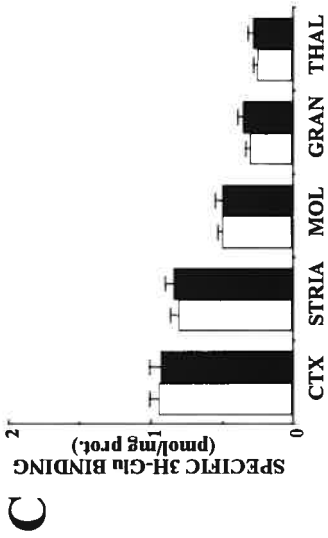
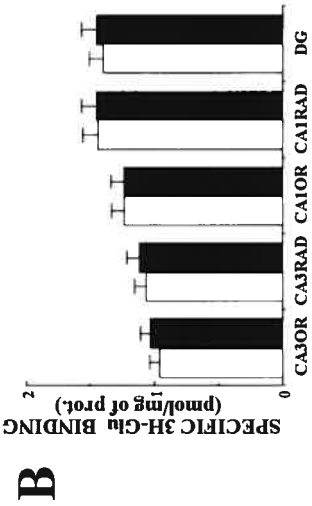
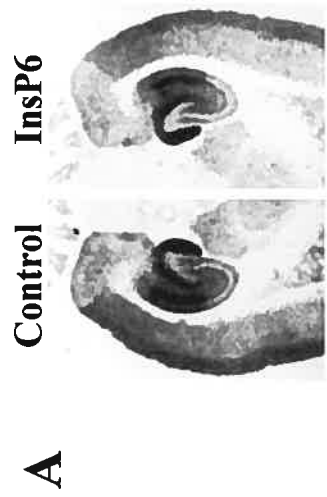
**FIGURE 6. Effects of various phosphate compounds and InsS6 on GluR1 subunits.** A: Adjacent horizontal sections at the level of the dorsal hippocampus were preincubated at 35°C for 1 h in the absence or presence of increasing concentrations (3–300  $\mu$ M) of InsP6 (solid circles), InsS6 (closed squares), and DPGA (solid triangles). B: Same as A for sections incubated with 100  $\mu$ M of various phosphate compounds and InsS6. Mitochondrial/synaptic (P2) fractions of rat brain sections were prepared by subcellular fractionation, and Western blots were performed using antibodies against the C-terminal domain of GluR1 subunits. Results are expressed as percent of control values found in P2 control fractions and represent the means  $\pm$  SEM of five experiments.

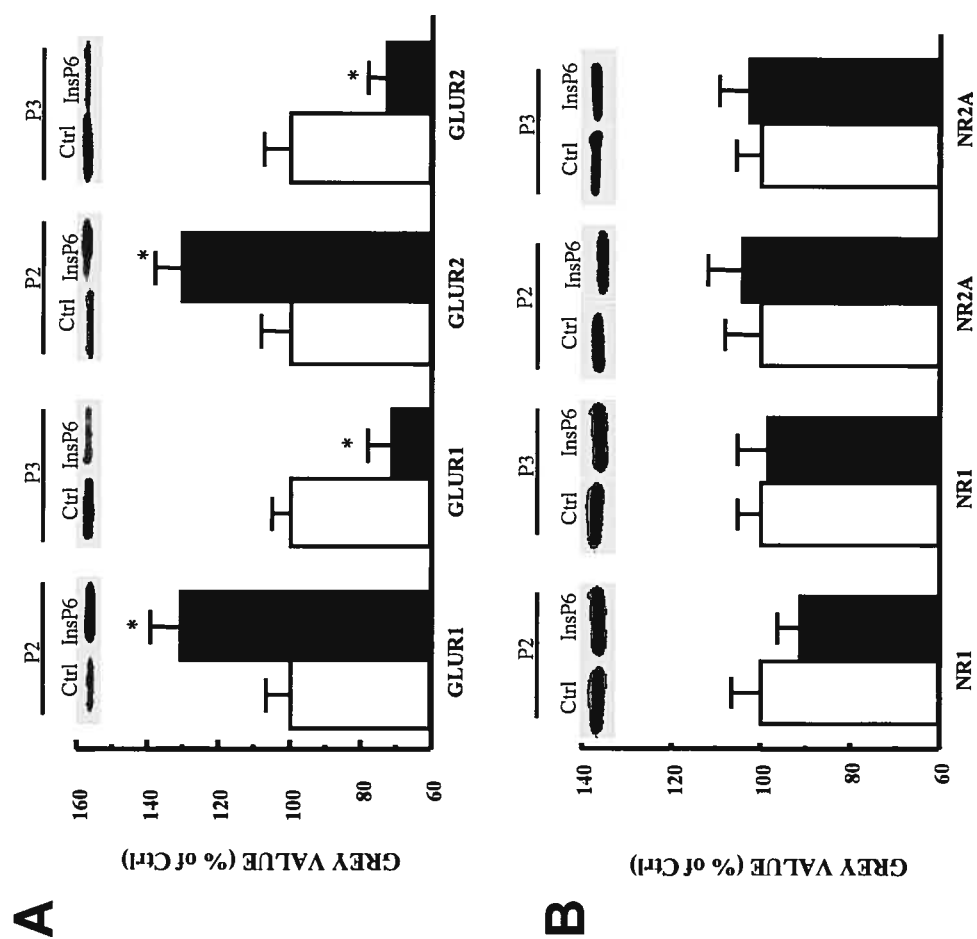
**FIGURE 7. Working model of InsP6-mediated modulation of AMPA receptor properties.** A: Downregulation of AMPA receptors is initiated by internalization, leading to a loss of receptors in plasma membranes. One of the components of receptor internalization is the clathrin assembly protein AP-2, which is required for coated pits and coated vesicle formation. B: InsP6 binding to AP-2 would block clathrin assembly and receptor internalization, promoting the maintenance of AMPA receptors in synaptic plasma membranes.

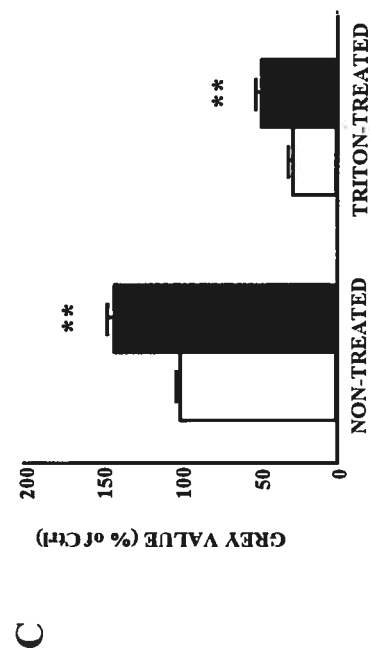
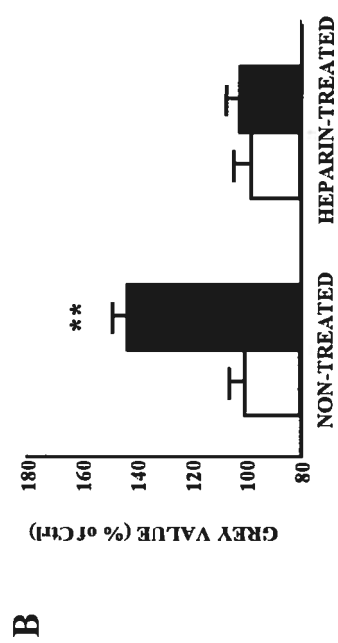
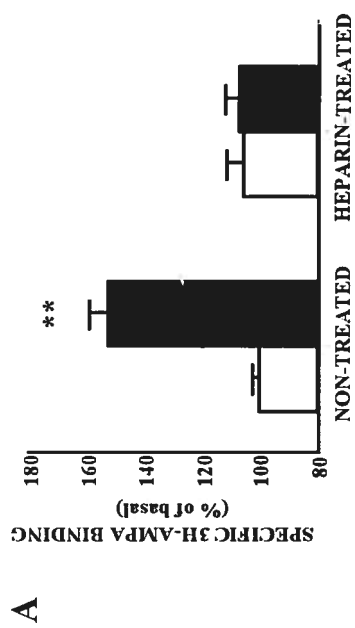


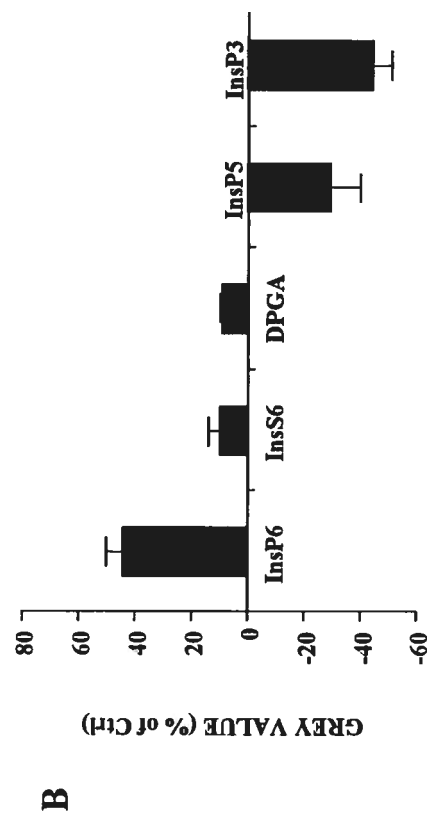
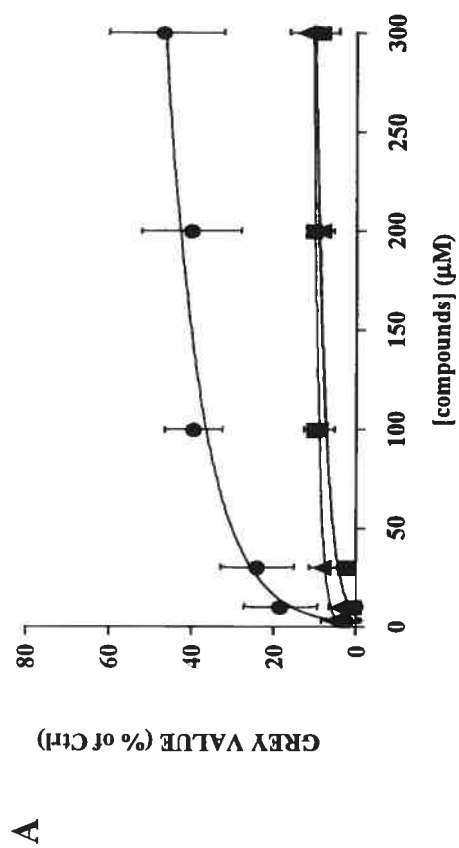


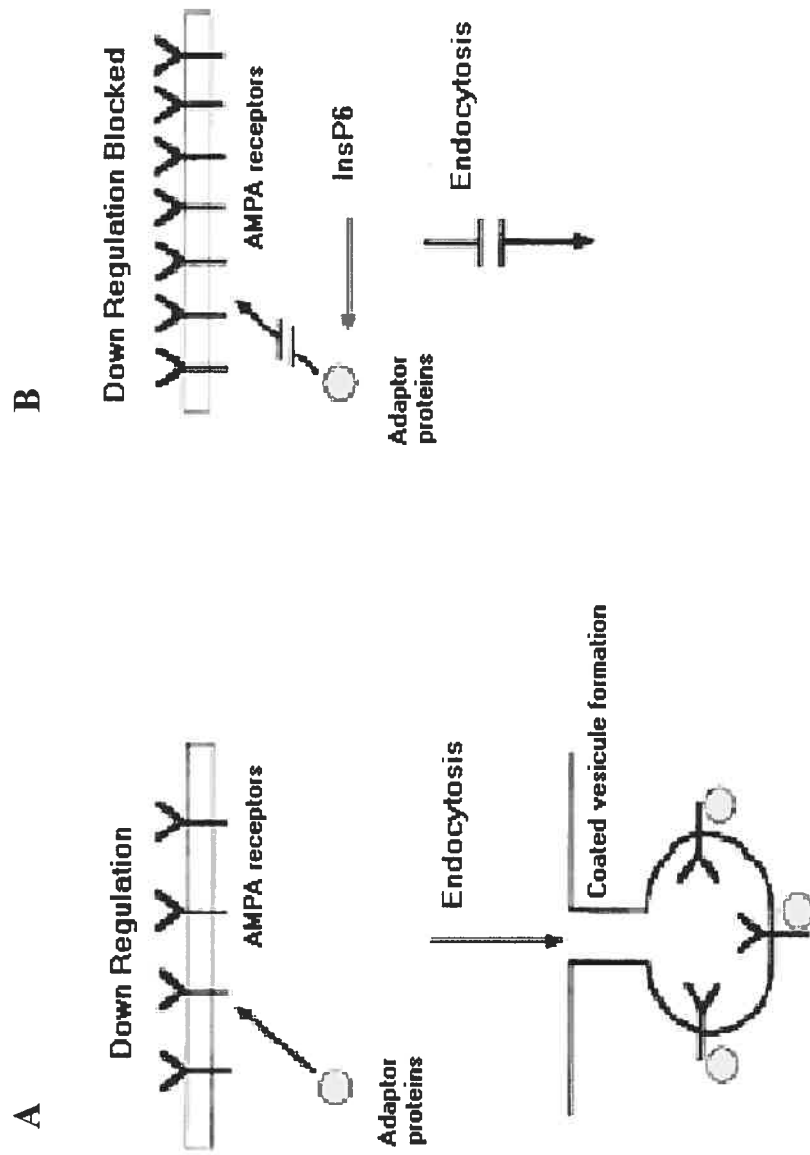












## **CHAPITRE 4**

### **DISCUSSION GÉNÉRALE**

## Discussion

Les données recueillies dans le cadre de cette thèse ont démontré que les problèmes d'apprentissage et de mémorisation rapportés chez les modèles animaux de la maladie d'Alzheimer et du diabète de type 1 sont corrélés à un déficit d'expression de la PLT dans la région CA1 de l'hippocampe. Bien que les mécanismes sous-jacents à ces déficits soient différents chez les souris NOD et déficientes en apoE, nous avons démontré l'importance du système glutamatergique dans la neurotransmission excitatrice (Valastro *et al.*, 2001a; Valastro *et al.*, 2002). Parallèlement, puisque le mouvement des RAMPA contribue aussi à la plasticité synaptique, nous nous sommes intéressés aux molécules endogènes qui seraient à même de réguler l'insertion ou le retrait des RAMPA au niveau synaptique (Valastro *et al.*, 2001b).

Pour faire suite aux résultats présentés dans les sections précédentes, nous tenterons, dans les pages qui suivent, d'expliquer les mécanismes cellulaires et biochimiques associés au déficit de PLT observé chez les souris NOD et déficientes en apolipoprotéine E, de même que le rôle de l'inositol hexakisphosphate (InsP6) dans la répartition des récepteurs AMPA et NMDA.



### ***Influence de la déficience en apolipoprotéine E sur la régulation des récepteurs AMPA***

Notre étude réalisée sur les souris déficientes en apolipoprotéine E nous a permis de définir les propriétés de liaison des récepteurs AMPA lors d'un état pathologique similaire à la maladie d'Alzheimer, mais aussi de comprendre les problèmes d'apprentissage et de mémorisation observés par plusieurs groupes de recherche chez ces animaux (Masliah *et al.*, 1995; Gordon *et al.*, 1996; Masliah *et al.*, 1997; Veinbergs *et al.*, 1998; Krzywkowski *et al.*, 1999; Teter and Ashford 2002). Tout d'abord, sur le plan électrophysiologique, nous avons démontré que l'amplitude de la PLT était diminuée dans la région CA1 de l'hippocampe des souris adultes déficientes en apoE (Valastro *et al.*, 2001). Si l'on considère l'hypothèse présynaptique voulant que ce phénomène résulte d'une augmentation de la relâche de neurotransmetteurs, ce déficit pourrait être associé à une relâche inadéquate de glutamate ou encore à la production insuffisante de messagers rétrogrades par l'élément postsynaptique (Bliss and Collingridge 1993). Par contre, une étude électrophysiologique réalisée sur ce modèle animal a démontré que les mécanisme présynaptique responsable de la relâche du glutamate n'était pas altéré par cette condition pathologique (Krzywkowski *et al.*, 1999), ce qui élimine l'hypothèse voulant que le déficit d'expression de la PLT soit associé une diminution de la relâche de neurotransmetteur. En ce qui a trait aux messagers rétrogrades, il peut être suggéré qu'une baisse d'activité de la PLA<sub>2</sub> soit à l'origine d'une diminution de la synthèse d'acide arachidonique (AA) (Krzywkowski *et al.*, 1999). Vu l'importance de ce messenger dans l'expression de la PLT, un changement de concentration serait à même de modifier

l'expression de ce phénomène électrophysiologique. Toutefois, puisque l'activité de la PLA<sub>2</sub> n'est pas diminuée dans l'hippocampe des souris adultes déficientes en apoE (Patrick *et al.*, 2000), il nous apparaît peu probable que le problème de potentialisation présenté dans notre étude soit causé par une diminution de la synthèse d'AA.

Tel que mentionné dans l'introduction, l'élément postsynaptique joue aussi un rôle important dans les phénomènes d'induction et d'expression de la PLT. Par conséquent, le fait que la fonction présynaptique semble intacte chez les souris adultes déficientes en apoE nous permet d'envisager que le déficit en PLT puisse être associé d'une part aux récepteurs NMDA responsables de l'induction de la PLT ou d'autre part à un changement de la régulation ou du nombre des RAMPAs présents dans la membrane synaptique.

Concernant la première hypothèse, une étude réalisée par le Dr Krzywkowski et ses collaborateurs a démontré que les propriétés biochimiques et électrophysiologiques du RNMDA n'étaient pas affectées par la condition pathologique de ces animaux (Krzywkowski *et al.*, 1999). Par conséquent, des modifications relatives à la conductance du canal ionique ou aux propriétés de liaison du RNMDA ne pourraient expliquer l'incapacité des neurones de la région CA1 à produire la PLT chez les souris adultes déficientes en apoE.

Dans le cas des RAMPAs, nos expériences d'autoradiographie quantitative n'ont révélé aucun changement concernant la liaison de l'agoniste 3H-AMPA aux récepteurs AMPA et ce, autant chez les souris adultes et âgées (Valastro *et al.*, 2001). Puisque ces résultats vont à l'encontre de l'hypothèse voulant que le nombre de récepteurs AMPA soit modifié par la déficience en apoE, nous suggérons que le déficit

en PLT soit plutôt le résultat d'une mauvaise régulation des RAMPA par les enzymes présentes au niveau cellulaire. À cet effet, plusieurs évidences expérimentales ont démontré que l'activation de la PLA<sub>2</sub> augmente l'affinité des récepteurs AMPA pour leur ligand alors que son inhibition prévient la formation de PLT dans la région CA1 de l'hippocampe (Massicotte *et al.*, 1990; Massicotte *et al.*, 1991). Parallèlement, il a été rapporté que l'augmentation d'affinité des RAMPA observé avec la PLA<sub>2</sub> était reproduit par l'incorporation de la phosphatidylsérine (PS) dans des sections cérébrales de rat (Gagne *et al.*, 1996). Puisqu'une étude récente stipule que le défaut de PLT observé chez les souris adultes déficientes en apoE serait associé à une mauvaise régulation des récepteurs AMPA par la PLA<sub>2</sub> (Patrick *et al.*, 2000), nous avons induit, à l'aide de la PS, des modifications lipidiques représentatives de celles induites par la PLA<sub>2</sub>. Cependant, notre étude a démontré que l'augmentation de liaison normalement observée suite à l'ajout de PS n'est pas reproduit chez les souris adultes déficientes en apoE (Valastro *et al.*, 2001), ce qui suggère que l'absence de potentialisation observée chez ces souris adultes résulterait d'une mauvaise régulation des RAMPA par l'environnement lipidique. D'ailleurs, des études similaires réalisées sur des rats et sur des rats diabétiques ont rapporté que l'absence de modulation des RAMPA par la PS était corrélée à un déficit en PLT (Gagne *et al.*, 1996; Gagne *et al.*, 1998).

Contrairement aux résultats obtenus chez les souris adultes, nous avons constaté que l'expression de la PLT était possible dans la région CA1 des souris âgées et que la PS n'influçait pas l'affinité des RAMPA pour le ligand 3H-AMPA (Valastro *et al.*, 2001). Puisque le déficit en apoE ne semble pas affecter le système glutama-

tergique de animaux âgés, nous suggérons qu'ils développent un mécanisme compensatoire leur permettant de diminuer les altérations causées par l'absence d'apoE (Valastro *et al.*, 2001). Bien que ce mécanisme reste à préciser, l'apolipoprotéine J (apoJ) pourrait peut-être expliquer les résultats observés chez les souris âgées. Impliquée dans le transport du cholestérol et des phospholipides cérébraux, cette apolipoprotéine jouerait un rôle protecteur à l'échelle du cerveau (Montpied *et al.*, 1998), ce qui laisse présager qu'elle pourrait compenser pour la perte des apolipoprotéines E chez les souris âgées. Parallèlement, puisque la perméabilité de la barrière hématoencéphalique est altérée chez ce modèle animal (Fullerton *et al.*, 2001), nous ne pouvons exclure la possibilité que les apolipoprotéines A et D plasmatiques pénètrent à l'intérieur du SNC et compensent elles aussi pour le déficit en apoE.

Malgré le fait que les souris âgées affichent des propriétés biochimiques et électrophysiologiques quasi normale, il est important de mentionner que des problèmes d'apprentissage ont été observés chez ces animaux dans le labyrinthe Morris ce qui soulève l'hypothèse que d'autres systèmes impliqués dans les processus d'apprentissage soient lésés chez ces souris âgées (Oitzl *et al.*, 1997).

À la lumière des résultats obtenus dans cette étude, nous pouvons affirmer que l'apoE influence le maintien de la plasticité synaptique de même que la régulation des récepteurs glutamatergiques de type AMPA.

### ***Influence des RNMDA lors du diabète de type 1***

Le diabète de type 1 est un désordre métabolique qui affecte à la fois le système nerveux périphérique et le système nerveux central. Bien que la perte de sensibilité des membres inférieurs et les problèmes de cécité soient les atteintes les plus fréquemment abordées lors du diabète, des troubles d'apprentissage et de mémorisation ont aussi été observés chez les patients et chez les modèles animaux atteints du diabète de type 1. Plus particulièrement, des problèmes électrophysiologiques, morphologiques et comportementaux comparables à ceux observés chez les souris déficientes en apolipoprotéine E ont été rapportés chez un modèle chimique de diabète de type 1. Plus précisément, un déficit d'expression de la PLT dépendante des RNMDA de même que des problèmes d'apprentissage dans les labyrinthes de Morris et en forme de T ont été observés chez les rats traités à la STZ (Flood *et al.*, 1990; Biessels *et al.*, 1996; Kamal *et al.*, 2000). De plus le déficit en PLT serait associé, tout comme chez les souris déficientes en apoE, à un problème postsynaptique puisque la fonction présynaptique semble bien préservée chez ces animaux diabétiques (Zucker 1989; Biessels *et al.*, 1996).

Bien que ce modèle chimique de diabète soit fréquemment utilisé, nous nous sommes tournés vers des souris génétiquement prédisposées au diabète de type 1, les souris NOD, dans le but d'étudier l'impact de la phase aiguë de la maladie sur les caractéristiques électrophysiologiques et biochimiques du système glutamatergique. Tel que mentionné précédemment, les données obtenues chez les rats traités à la STZ reflètent les conséquences de trois mois de diabète alors que celles fournies par les

souris NOD permettent d'évaluer l'impact de l'hyperglycémie précoce et non contrôlée sur le SNC.

Tout comme chez les souris déficientes en apoE, notre étude électrophysiologique a révélé la présence d'un déficit d'expression de la PLT dépendante des récepteurs NMDA dans la région CA1 des souris NOD (Valastro *et al.*, 2002). Puisque les mêmes observations ont été réalisées chez les rats traités à la streptozotocine, ceci suggère que les caractéristiques physiopathologiques du diabète de type 1, soit l'hyperglycémie et l'hypoinsulinémie, altèrent la transmission synaptique dans cette région de l'hippocampe (Chabot *et al.*, 1997). D'ailleurs, il a été démontré qu'une augmentation importante du glucose sanguin affecte les mécanismes sous-jacents à l'expression de la PLT alors qu'une hyperglycémie modérée de l'ordre de 15mmol/L ne serait pas associée à un déficit de potentialisation (Biessels *et al.*, 1996). Puisque nous avons démontré que le déficit en PLT était renversé par l'injection d'insuline, nos observations vont dans le même sens que celles rapportées par l'équipe du Dr Biessels et suggèrent que l'état hyperglycémique soit bel et bien responsable des atteintes du SNC lors du diabète.

Du point de vue biochimique, l'autoradiographie quantitative et la technique d'immunobuvardage de type Western ont permis d'associer le déficit de potentialisation à la présence de RNMDA atypiques chez les souris NOD. Tout d'abord, une augmentation significative de la liaison du 3H-Glutamate aux RNMDA a été observée dans la région de l'hippocampe et du cortex interne, laquelle serait associée, dans le cas du cortex interne, à une augmentation du nombre de sites de liaison pour le glutamate plutôt qu'à un changement d'affinité du récepteur pour son ligand.

(Valastro *et al.*, 2002). Puisque la liaison de l'agoniste 3H-Glutamate est assurée par la sous-unité NR2, nous avons émis l'hypothèse que le nombre de sous-unités NR2 soit augmenté chez ces souris. Au niveau expérimental, cette suggestion a été confirmée par la technique d'immunobuvardage de type Western puisqu'une augmentation significative de la sous-unité NR2A a été observée chez les souris NOD. Concernant l'implication de cette sous-unité dans la neurotransmission excitatrice, sa présence semble nécessaire à la formation de la PLT dans certaines régions du cerveau puisque son association avec NR1 génère une entrée calcique cinq fois plus importante que toute autre association de sous-unités (Medina *et al.*, 1995; Grant *et al.*, 1997). À la lumière de ces informations relatives à la conductance des RNMDA, l'augmentation de la sous-unité NR2A rapportée chez les souris NOD suggère qu'il y ait une entrée massive de calcium dans l'élément postsynaptique, un phénomène reconnu comme étant toxique pour les cellules nerveuses. Par conséquent, nous ne pouvons exclure la possibilité que l'expression de récepteurs NMDA atypiques explique les problèmes de potentialisation observés chez les souris NOD. Cependant, il est important de mentionner qu'un contrôle rigoureux de la glycémie par l'insuline renverse l'augmentation de la sous-unité NR2A de même que le déficit de potentialisation chez ces animaux.

Dans le même ordre d'idée, nous savons que l'augmentation intracellulaire de calcium généré suite à l'ouverture des canaux NMDA influence l'activation des enzymes calcium-dépendantes et conséquemment les propriétés de liaison des RAMPA. À ce sujet, une augmentation de la liaison de l'agoniste tritié 3H-AMPA a été démontrée dans la plupart des régions cérébrales des souris NOD, plus particulièrement au

niveau de l'hippocampe (Valastro *et al.*, 2002). Contrairement aux RNMDA, cette augmentation de liaison serait associée à un changement d'affinité du récepteur pour le ligand plutôt qu'à une augmentation du nombre de sites de liaison. Bien que les causes exactes de ce changement d'affinité ne soient pas établies, il est bien connu que la PLA<sub>2</sub> régule la liaison du RAMPa via des modifications de l'environnement lipidique des récepteurs. Par conséquent, nous pourrions avancer l'hypothèse que le changement d'affinité des RAMPa soit associé à l'activation accrue de la PLA<sub>2</sub> et ce, conséquemment à l'entrée importante de calcium via les RNMDA atypiques présents au niveau postsynaptique. Parallèlement, des résultats préliminaires ont démontré que l'ajout de PS sur des sections de souris NOD diminuait la liaison de l'agoniste 3H-AMPA à son récepteur, ce qui propose, tout comme dans l'étude précédente, qu'un changement de l'environnement du récepteur soit à l'origine de l'augmentation d'affinité des RAMPa observée chez les souris NOD. Bien que cette hypothèse soit très plausible, nous avons aussi vérifié si la composition des RAMPa pouvait être responsable de cette augmentation de liaison mais aucune différence d'expression n'a été observée pour les sous-unités GluR1 et GluR2/3.

Pour terminer, l'ensemble des résultats présentés dans cette étude suggère que l'état hyperglycémique présent lors du diabète affecte les caractéristiques biochimiques et électrophysiologiques des souris NOD. Puisque le déficit de PLT et l'augmentation du nombre de sites de liaison au niveau des RNMDA sont renversés par un traitement à l'insuline, ces observations proposent qu'un mauvais contrôle de la glycémie chez des patients diabétiques puisse être à l'origine des problèmes cognitifs présents lors du diabète de type 1.



## ***Régulation des récepteurs au glutamate par les inositols polyphosphates***

Tel que mentionné dans les deux sections précédentes, la régulation du système glutamatergique contribue au bon fonctionnement de la transmission synaptique. Bien que le diabète et la maladie d'Alzheimer affectent différemment les récepteurs AMPA et NMDA, elles ont en commun une caractéristique métabolique importante, c'est-à-dire de voir leur concentration intracellulaire de myo-inositol fluctuer avec la pathologie. Dans le cas du diabète de type 1, le ralentissement de la conduction nerveuse et la perte de sensibilité présente chez les patients seraient associés à une diminution de la quantité d'inositol à l'intérieur des neurones. Plus précisément, cette baisse d'inositol serait corrélée à l'augmentation du glucose sanguin puisqu'il est suggéré qu'un contrôle étroit de la glycémie prévienne ce déficit et améliore l'activité de la pompe  $\text{Na}^+ - \text{K}^+ - \text{ATPase}$  responsable de la conduction de l'influx nerveux (Yorek *et al.*, 1993b; Yorek *et al.*, 1993a). De plus, il a été démontré de façon expérimentale qu'un supplément alimentaire d'inositol diminuait, chez les rats, les symptômes périphériques associés au diabète en augmentant l'activité de la pompe  $\text{Na}^+ - \text{K}^+ - \text{ATPase}$  (Yorek *et al.*, 1993). Toujours dans le même ordre d'idée, une étude réalisée sur des rats traités à la streptozotocine a démontré que la concentration de myo-inositol n'était pas affecté chez ces animaux, mais que la perméabilisation de la barrière hématoencéphalique normalement présente chez ce modèle était renversée par les myo-inositols (Knudsen *et al.*, 1989).

Dans le cas de la maladie d'Alzheimer, différentes études ont démontré que la concentration de myo-inositol était augmentée de 15% dans le cerveau des patients

atteints par la maladie (Antuono *et al.*, 2001; Huang *et al.*, 2001; Chantal *et al.*, 2002; Firbank *et al.*, 2002). À ce niveau, l'association entre les myo-inositols et une forme soluble d'amyloïde nommée A $\beta$ 42 serait responsable de la formation des plaques séniles caractéristiques de cette maladie neurodégénérative. Toutefois, ce complexe myo-inositol/A $\beta$ 42 ne semble pas toxique lorsque testé sur des cellules PC12 et sur des cultures primaires de neurones (McLaurin *et al.*, 2000).

Bien que les inositols soient associés au diabète et à la maladie d'Alzheimer, très peu d'information est disponible quant à l'impact des différents inositols sur les récepteurs responsables des processus de mémorisation, en l'occurrence les récepteurs glutamatergiques. Puisque nous avons démontré dans les deux études précédentes que les récepteurs AMPA et NMDA sont modifiés par les caractéristiques physiopathologiques du diabète et de la maladie d'Alzheimer, nous nous sommes intéressés à l'impact que peut avoir les myo-inositols, et plus particulièrement le D-myo-inositol 1,2,3,4,5,6 hexakisphosphate (InsP6) sur les récepteurs glutamatergiques de type ionotrope.

Les premiers résultats obtenus avec la technique d'autoradiographie quantitative ont révélé une augmentation de la liaison du ligand 3H-AMPA en présence d'InsP6, laquelle serait circonscrite à la région hippocampale et au cervelet (Valastro *et al.*, 2001). Puisque les sites de liaison pour l'InsP6 sont aussi présents ces deux régions cérébrales (Hawkins *et al.*, 1990; Parent and Quirion 1994), il est possible que l'InsP6 intervienne, via l'activation des différents mécanismes cellulaires, dans la régulation des récepteurs AMPA. D'ailleurs, il a été démontré que l'InsP6 régule la liaison d'autres récepteurs, dont celui pour le facteur de croissance à l'insuline (IGF

II) et pour la substance P, ce qui renforce l'idée voulant que cette molécule puisse modifier les caractéristiques de liaison du RAMPa (Kar *et al.*, 1994). Concernant les récepteurs NMDA, l'InsP6 n'aurait aucun impact sur les propriétés de liaison de ces récepteurs puisqu'aucune différence de liaison n'a été observée avec le 3H-Glutamate dans les régions cérébrales de rat. Bien que ces résultats suggèrent que les récepteurs glutamatergiques de type ionotrope soient régulés différemment par l'InsP6, ceci n'est guère surprenant compte tenu du fait que les propriétés des RNMDA ne sont pas régulées par les mêmes mécanismes cellulaires que les RAMPa. Par exemple, la PLA<sub>2</sub> n'influencerait pas la liaison des agonistes aux RNMDA et il en serait de même pour la régulation par la PS (Massicotte and Baudry 1990; Gagne *et al.*, 1996).

Du point de vue fonctionnel, la molécule d'InsP6 est impliquée dans le mouvement des vésicules synaptiques et dans la répartition des récepteurs entre la membrane synaptique et le compartiment intracellulaire (Sasakawa *et al.*, 1995). Pour ce faire, l'InsP6 doit interagir avec différentes protéines responsables du mouvement des récepteurs dont la molécule adaptatrice AP-2 (Timerman *et al.*, 1992; Voglmaier *et al.*, 1992). Impliquée dans le recrutement des récepteurs destinés à l'endocytose, l'AP-2 interagit avec le domaine C-terminal de la sous-unité GluR2 des RAMPa et mène à l'internalisation des récepteurs via un mécanisme clathrine-dépendant (Man *et al.*, 2000). Puisque l'InsP6 interagit avec l'AP-2 et que cette liaison prévient l'assemblage de la clathrine, nous nous sommes intéressés à l'effet de l'InsP6 sur la répartition des sous-unités GluR1 et GluR2/3 des récepteurs AMPA entre la membrane synaptique et le compartiment intracellulaire. Concernant ces sous-unités, une augmentation d'immunoréactivité a été observée dans la fraction synaptique (P2)

alors qu'une diminution a été rapportée dans la fraction microsomale (P3). De plus, nous avons démontré que cette répartition des sous-unités GluR1 et GluR2/3 était renversée par l'héparine, une molécule endogène qui abolit la liaison InsP6/AP-2 (Theibert *et al.*, 1991). Par conséquent, ces observations, de même que celles rapportant que l'AP-2 et l'EPS15 sont localisés près des RAMPA (Carroll *et al.*, 1999; Man *et al.*, 2000), renforcent l'idée que les RAMPA soient endocytés via un mécanisme dépendant de la clathrine et que l'InsP6 inhibe ce phénomène en empêchant l'association de l'AP-2 avec la clathrine.

Bien que les premiers résultats obtenus avec l'InsP6 suggèrent que cette molécule prévienne l'endocytose des RAMPA, l'authenticité de cet effet doit être vérifiée puisque nous ne pouvons exclure la possibilité qu'il soit causé par la déphosphorylation de la molécule d'InsP6. Par conséquent, nous nous sommes intéressés à l'effet de l'InsP3, du DPGA et de l'InsP5 sur la répartition des sous-unités du RAMPA. Du point de vue expérimental, l'augmentation de la sous-unité GluR1 rapportée avec l'InsP6 semble spécifique à cette forme d'inositol puisqu'elle n'est pas reproduite par les autres composés utilisés, bien que ceux-ci modulent chacun à leur façon les RAMPA. Dans le même ordre d'idée, nous avons aussi vérifié l'hypothèse que les charges négatives de l'InsP6 puissent être à l'origine de l'effet observé sur les RAMPA. Toutefois, l'utilisation de l'InsS6, une molécule aussi chargée que l'InsP6, n'a pas reproduit l'effet sur les RAMPA ce qui permet de conclure à la spécificité des résultats observés.

Concernant les RNMDA, l'InsP6 ne semble pas affecter la répartition des sous-unités NR1 et NR2A puisque aucune différence n'a été rapportée entre le com-

partiment synaptique et microsomal. Bien qu'il ait longtemps été admis que les RNMDA étaient très peu mobiles, des données récentes suggèrent que ce récepteur soit apte à changer de compartiment et que ce changement de position serait régulé par les sous-unités qui le composent (Barria and Malinow 2002). Par conséquent, les données rapportées dans notre étude vont à l'encontre des récents développements dans le domaine des récepteurs au glutamate. Par contre, si l'on s'attarde à ces nouvelles observations concernant les RNMDA, elles stipulent que le mouvement des récepteurs se produit lors du développement et plus précisément que les sous-unités NR2A remplacent les sous-unités NR2B présentes dans les neurones immatures. Puisque nous avons utilisé des animaux adultes dans notre étude, ceci pourrait en partie expliquer pourquoi nous n'avons pas observé de tel changement. Aussi, il semblerait que le remplacement des sous-unités NR2B par les sous-unités NR2A requière la présence d'une activité synaptique quelconque ou simplement d'une relâche spontanée de neurotransmetteurs, ce qui n'est pas présent dans notre modèle expérimental.

Pour terminer, il est bien connu que les récepteurs AMPA et NMDA localisés dans la densité postsynaptique interagissent avec différentes protéines d'ancrage. Par conséquent, il est possible que l'InsP6 interfère avec les protéines associées aux RAMPA mais pas avec celles associées aux RNMDA, d'où les résultats différentiels observés lors de cette étude. Des expériences plus approfondies, utilisant la culture de neurones dissociés, permettraient éventuellement de mieux caractériser ce phénomène et surtout l'impact des différents inositols sur le mouvement des récepteurs.

## Conclusion

Au fil des ans, les recherches ont su démontrer l'importance du neurotransmetteur glutamate dans le système nerveux central (SNC) de même que son implication dans les processus d'apprentissage et de mémorisation. Par contre, plusieurs chercheurs sont également d'avis que l'activation excessive des récepteurs au glutamate joue un rôle primordial dans l'apparition de certaines maladies neurodégénératives dont la maladie d'Alzheimer et les accidents vasculaires cérébraux (AVC).

Au cours de la dernière décennie, les études portant sur la maladie d'Alzheimer ont grandement été influencées par la découverte d'une relation entre le niveau d'expression de l'apolipoprotéine E (apoE) et l'incidence de la maladie. De plus, des problèmes de mémorisation ont aussi été rapportés chez les sujets âgés souffrant de diabète, ces derniers étant d'ailleurs plus à risque de développer une démence de type Alzheimer. Puisque les mécanismes à l'origine de ces atteintes neuronales demeurent inconnus, le présent travail visait à élucider l'impact de l'apoE et du diabète sur la fonction glutamatergique du cerveau.

Utilisant la potentialisation à long terme comme modèle électrophysiologique de la mémoire, nous avons constaté que la déficience en apoE entraîne une perte d'expression de la PLT dans la région CA1 de l'hippocampe. En plus de ces perturbations électrophysiologiques, la capacité des phospholipides à moduler l'affinité des récepteurs AMPA semble aussi perturbée chez les souris adultes déficientes en apoE. Toutefois, il est important de mentionner que ces altérations électrophysiologiques et biochimiques s'atténuent chez les souris âgées ce qui suggère la présence de méca-

nismes compensatoires susceptibles de freiner les effets néfastes du vieillissement. Dans le même ordre d'idée, un déficit de PLT a également été constaté chez les souris NOD présentant un diabète de type 1. Dans ce cas précis, les effets néfastes du diabète découleraient, non pas d'une perturbation des récepteurs AMPA mais plutôt d'altérations au niveau des récepteurs NMDA. En fait, nous concluons que ce phénomène pourrait expliquer, du moins en partie, la grande vulnérabilité des personnes diabétiques face aux maladies neurodégénératives.

À la lumière des résultats mentionnés ci-dessus, la régulation des récepteurs au glutamate apparaît donc caractéristique des troubles cognitifs rencontrés chez les animaux souffrant de diabète et présentant un statut anormal en apoE. Indépendamment de ces considérations pathologiques, notre compréhension des mécanismes cellulaires impliqués dans la régulation des récepteurs glutamatergiques membranaires reste incomplète. Par contre, on reconnaît l'importance que joue les inositols phosphates dans les processus de signalisation et de trafic cellulaire. Selon notre étude, l'inositol hexakisphosphate (InsP6) est en mesure d'accentuer l'accumulation des récepteurs AMPA au niveau de la membrane neuronale et ce, à la défaveur des réserves intracellulaires. L'effet rapporté s'avère spécifique aux récepteurs AMPA présents dans les membranes synaptiques et est particulièrement marqué dans la région hippocampale. Puisque la concentration d'InsP6 varie selon le niveau d'activité des cellules nerveuses, il est possible d'imaginer que ce métabolite augmente la fonction des récepteurs AMPA et, par le fait même, favorise la formation des souvenirs.

En conclusion, l'ensemble des résultats présentés dans cette thèse suggèrent que l'altération du système glutamatergique constitue une étape importante dans l'apparition des problèmes mnésiques associés à la maladie d'Alzheimer et au diabète de type 1, et supporte la notion que les inositols phosphates soient en mesure d'altérer la communication neuronale assurée par les récepteurs AMPA. Sur le plan thérapeutique, nous en déduisons qu'il serait intéressant d'évaluer si les médicaments commercialisés dans le but de freiner les dommages cognitifs chez les sujets Alzheimer renversent les problèmes de régulation et de PLT rapportés dans les modèles animaux étudiés dans le présent ouvrage.



## RÉFÉRENCES

- Ahlander, M., I. Misane, P. A. Schott and S. O. Ogren 1999. A behavioral analysis of the spatial learning deficit induced by the NMDA receptor antagonist MK-801 (dizocilpine) in the rat. *Neuropsychopharmacology* 21(3): 414-26.
- Alessandri, B., K. Battig and H. Welzl 1989. Effects of ketamine on tunnel maze and water maze performance in the rat. *Behav Neural Biol* 52(2): 194-212.
- Alle, H., P. Jonas and J. R. Geiger 2001. PTP and LTP at a hippocampal mossy fiber-interneuron synapse. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98(25): 14708-13.
- Allison, D. W., V. I. Gelfand, I. Spector and A. M. Craig 1998. Role of actin in anchoring postsynaptic receptors in cultured hippocampal neurons: differential attachment of NMDA versus AMPA receptors. *J Neurosci* 18(7): 2423-36.
- Antuono, P. G., J. L. Jones, Y. Wang and S. J. Li 2001. Decreased glutamate + glutamine in Alzheimer's disease detected in vivo with (1)H-MRS at 0.5 T. *Neurology* 56(6): 737-42.
- Anwyl, R. 1999. Metabotropic glutamate receptors: electrophysiological properties and role in plasticity. *Brain Res Brain Res Rev* 29(1): 83-120.
- Attucci, S., G. V. Clodfelter, O. Thibault, J. Staton, F. Moroni, P. W. Landfield and N. M. Porter 2002. Group I metabotropic glutamate receptor inhibition selectively blocks a prolonged Ca(2+) elevation associated with age-dependent excitotoxicity. *Neuroscience* 112(1): 183-94.
- Balazs, L. and M. Leon 1994. Evidence of an oxidative challenge in the Alzheimer's brain. *Neurochem Res* 19(9): 1131-7.
- Banke, T. G., D. Bowie, H. Lee, R. L. Huganir, A. Schousboe and S. F. Traynelis 2000. Control of GluR1 AMPA receptor function by cAMP-dependent protein kinase. *J Neurosci* 20(1): 89-102.
- Barker, C. J., I. B. Leibiger, B. Leibiger and P. O. Berggren 2002. Phosphorylated inositol compounds in beta -cell stimulus-response coupling. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 283(6): E1113-22.
- Barria, A. and R. Malinow 2002. Subunit-specific NMDA receptor trafficking to synapses. *Neuron* 35(2): 345-53.
- Bashir, Z. I. and G. L. Collingridge 1994. An investigation of depotentiation of long-term potentiation in the CA1 region of the hippocampus. *Exp Brain Res* 100(3): 437-43.

Beattie, E. C., R. C. Carroll, X. Yu, W. Morishita, H. Yasuda, M. von Zastrow and R. C. Malenka 2000. Regulation of AMPA receptor endocytosis by a signaling mechanism shared with LTD. *Nat Neurosci* 3(12): 1291-300.

Berry, G. T., Z. J. Wang, S. F. Dreha, B. M. Finucane and R. A. Zimmerman 1999. In vivo brain myo-inositol levels in children with Down syndrome. *J Pediatr* 135(1): 94-7.

Bi, X., V. Chang, E. Molnar, R. A. McIlhinney and M. Baudry 1996. The C-terminal domain of glutamate receptor subunit 1 is a target for calpain-mediated proteolysis. *Neuroscience* 73(4): 903-6.

Bi, X., Y. Rong, J. Chen, S. Dang, Z. Wang and M. Baudry 1998. Calpain-mediated regulation of NMDA receptor structure and function. *Brain Res* 790(1-2): 245-53.

Bi, X., S. Standley and M. Baudry 1998. Posttranslational regulation of ionotropic glutamate receptors and synaptic plasticity. *Int Rev Neurobiol* 42: 227-84.

Biessels, G. J., A. Kamal, G. M. Ramakers, I. J. Urban, B. M. Spruijt, D. W. Erkelens and W. H. Gispen 1996. Place learning and hippocampal synaptic plasticity in streptozotocin-induced diabetic rats. *Diabetes* 45(9): 1259-66.

Bischoff, C. and P. I. Tiedtke 1992. Competitive and non-competitive NMDA receptor antagonists in spatial learning tasks. *Eur J Pharmacol* 213(2): 269-73.

Bliss, T. V. and G. L. Collingridge 1993. A synaptic model of memory: long-term potentiation in the hippocampus. *Nature* 361(6407): 31-9.

Bliss, T. V. and T. Lomo 1973. Long-lasting potentiation of synaptic transmission in the dentate area of the anaesthetized rabbit following stimulation of the perforant path. *J Physiol* 232(2): 331-56.

Bohme, G. A., C. Bon, J. M. Stutzmann, A. Doble and J. C. Blanchard 1991. Possible involvement of nitric oxide in long-term potentiation. *Eur J Pharmacol* 199(3): 379-81.

Bolhuis, J. J. and I. C. Reid 1992. Effects of intraventricular infusion of the N-methyl-D-aspartate (NMDA) receptor antagonist AP5 on spatial memory of rats in a radial arm maze. *Behav Brain Res* 47(2): 151-7.

Buschard, K. 1996. Diabetic animal models. *Apmis* 104(9): 609-14.

Carroll, R. C., E. C. Beattie, H. Xia, C. Luscher, Y. Altschuler, R. A. Nicoll, R. C. Malenka and M. von Zastrow 1999. Dynamin-dependent endocytosis of ionotropic glutamate receptors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96(24): 14112-7.

Castillo, P. E., R. C. Malenka and R. A. Nicoll 1997. Kainate receptors mediate a slow postsynaptic current in hippocampal CA3 neurons. *Nature* 388(6638): 182-6.

Castillo, P. E., M. G. Weisskopf and R. A. Nicoll 1994. The role of  $\text{Ca}^{2+}$  channels in hippocampal mossy fiber synaptic transmission and long-term potentiation. *Neuron* 12(2): 261-9.

Chabot, C., J. Gagne, C. Giguere, J. Bernard, M. Baudry and G. Massicotte 1998. Bidirectional modulation of AMPA receptor properties by exogenous phospholipase A2 in the hippocampus. *Hippocampus* 8(3): 299-309.

Chabot, C., G. Massicotte, M. Milot, F. Trudeau and J. Gagne 1997. Impaired modulation of AMPA receptors by calcium-dependent processes in streptozotocin-induced diabetic rats. *Brain Res* 768(1-2): 249-56.

Champagne, D., J. B. Dupuy, J. Rochford and J. Poirier 2002. Apolipoprotein E knockout mice display procedural deficits in the Morris water maze: analysis of learning strategies in three versions of the task. *Neuroscience* 114(3): 641-54.

Chantal, S., M. Labelle, R. W. Bouchard, C. M. Braun and Y. Boulanger 2002. Correlation of regional proton magnetic resonance spectroscopic metabolic changes with cognitive deficits in mild Alzheimer disease. *Arch Neurol* 59(6): 955-62.

Chittajallu, R., M. Vignes, K. K. Dev, J. M. Barnes, G. L. Collingridge and J. M. Henley 1996. Regulation of glutamate release by presynaptic kainate receptors in the hippocampus. *Nature* 379(6560): 78-81.

Christie, B. R., K. M. Franks, J. K. Seamans, K. Saga and T. J. Sejnowski 2000. Synaptic plasticity in morphologically identified CA1 stratum radiatum interneurons and giant projection cells. *Hippocampus* 10(6): 673-83.

Chung, H. J., J. Xia, R. H. Scannevin, X. Zhang and R. L. Huganir 2000. Phosphorylation of the AMPA receptor subunit GluR2 differentially regulates its interaction with PDZ domain-containing proteins. *J Neurosci* 20(19): 7258-67.

Coghlan, V. M., B. A. Perrino, M. Howard, L. K. Langeberg, J. B. Hicks, W. M. Gallatin and J. D. Scott 1995. Association of protein kinase A and protein phosphatase 2B with a common anchoring protein. *Science* 267(5194): 108-11.

Conn, P. J. and J. P. Pin 1997. Pharmacology and functions of metabotropic glutamate receptors. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 37: 205-37.

Dale, L. B., A. V. Babwah and S. S. Ferguson 2002. Mechanisms of metabotropic glutamate receptor desensitization: role in the patterning of effector enzyme activation. *Neurochem Int* 41(5): 319-26.

Di Luca, M., L. Ruts, F. Gardoni, F. Cattabeni, G. J. Biessels and W. H. Gispen 1999. NMDA receptor subunits are modified transcriptionally and post-translationally in the brain of streptozotocin-diabetic rats. *Diabetologia* 42(6): 693-701.

Dingledine, R., K. Borges, D. Bowie and S. F. Traynelis 1999. The glutamate receptor ion channels. *Pharmacol Rev* 51(1): 7-61.

Efanov, A. M., S. V. Zaitsev and P. O. Berggren 1997. Inositol hexakisphosphate stimulates non-Ca<sup>2+</sup>-mediated and primes Ca<sup>2+</sup>-mediated exocytosis of insulin by activation of protein kinase C. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94(9): 4435-9.

Ehlers, M. D. 2000. Reinsertion or degradation of AMPA receptors determined by activity-dependent endocytic sorting. *Neuron* 28(2): 511-25.

Ferguson, S. C., A. Blane, P. Perros, R. J. McCrimmon, J. J. Best, J. Wardlaw, I. J. Deary and B. M. Frier 2003. Cognitive ability and brain structure in type 1 diabetes: relation to microangiopathy and preceding severe hypoglycemia. *Diabetes* 52(1): 149-56.

Firbank, M. J., R. M. Harrison and J. T. O'Brien 2002. A comprehensive review of proton magnetic resonance spectroscopy studies in dementia and Parkinson's disease. *Dement Geriatr Cogn Disord* 14(2): 64-76.

Fisher, S. K., J. E. Novak and B. W. Agranoff 2002. Inositol and higher inositol phosphates in neural tissues: homeostasis, metabolism and functional significance. *J Neurochem* 82(4): 736-54.

Flood, J. F., A. D. Mooradian and J. E. Morley 1990. Characteristics of learning and memory in streptozocin-induced diabetic mice. *Diabetes* 39(11): 1391-8.

Franceschi, M., R. Cecchetto, F. Minicucci, S. Smizne, G. Baio and N. Canal 1984. Cognitive processes in insulin-dependent diabetes. *Diabetes Care* 7(3): 228-31.

Francis, P. T., A. M. Palmer, M. Snape and G. K. Wilcock 1999. The cholinergic hypothesis of Alzheimer's disease: a review of progress. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 66(2): 137-47.

Fullerton, S. M., G. A. Shirman, W. J. Strittmatter and W. D. Matthew 2001. Impairment of the blood-nerve and blood-brain barriers in apolipoprotein e knockout mice. *Exp Neurol* 169(1): 13-22.

Gagne, J., S. Gelinas, M. G. Martinoli, T. C. Foster, M. Ohayon, R. F. Thompson, M. Baudry and G. Massicotte 1998. AMPA receptor properties in adult rat hippocampus following environmental enrichment. *Brain Res* 799(1): 16-25.

Gagne, J., C. Giguere, G. Tocco, M. Ohayon, R. F. Thompson, M. Baudry and G. Massicotte 1996. Effect of phosphatidylserine on the binding properties of glutamate receptors in brain sections from adult and neonatal rats. *Brain Res* 740(1-2): 337-45.

Gagne, J., M. Milot, S. Gelinas, A. Lahsaini, F. Trudeau, M. G. Martinoli and G. Massicotte 1997. Binding properties of glutamate receptors in streptozotocin-induced diabetes in rats. *Diabetes* 46(5): 841-6.

Gaiarsa, J. L., L. Zagrean and Y. Ben-Ari 1994. Neonatal irradiation prevents the formation of hippocampal mossy fibers and the epileptic action of kainate on rat CA3 pyramidal neurons. *J Neurophysiol* 71(1): 204-15.

Gispén, W. H. and G. J. Biessels 2000. Cognition and synaptic plasticity in diabetes mellitus. *Trends Neurosci* 23(11): 542-9.

Gordon, I., I. Genis, E. Grauer, E. Sehayek and D. M. Michaelson 1996. Biochemical and cognitive studies of apolipoprotein-E-deficient mice. *Mol Chem Neuropathol* 28(1-3): 97-103.

Grant, E. R., B. J. Bacskai, D. E. Pleasure, D. B. Pritchett, M. J. Gallagher, S. J. Kendrick, L. J. Kricka and D. R. Lynch 1997. N-methyl-D-aspartate receptors expressed in a nonneuronal cell line mediate subunit-specific increases in free intracellular calcium. *J Biol Chem* 272(1): 647-56.

Grodstein, F., J. Chen, R. S. Wilson and J. E. Manson 2001. Type 2 diabetes and cognitive function in community-dwelling elderly women. *Diabetes Care* 24(6): 1060-5.

Hawkins, P. T., D. J. Reynolds, D. R. Poyner and M. R. Hanley 1990. Identification of a novel inositol phosphate recognition site: specific [<sup>3</sup>H]inositol hexakisphosphate binding to brain regions and cerebellar membranes. *Biochem Biophys Res Commun* 167(2): 819-27.

Heath, P. R. and P. J. Shaw 2002. Update on the glutamatergic neurotransmitter system and the role of excitotoxicity in amyotrophic lateral sclerosis. *Muscle Nerve* 26(4): 438-58.

Hollmann, M. and S. Heinemann 1994. Cloned glutamate receptors. *Annu Rev Neurosci* 17: 31-108.

Huang, W., G. E. Alexander, L. Chang, H. U. Shetty, J. S. Krasuski, S. I. Rapoport and M. B. Schapiro 2001. Brain metabolite concentration and dementia severity in Alzheimer's disease: a (1)H MRS study. *Neurology* 57(4): 626-32.

Iino, M., M. Koike, T. Isa and S. Ozawa 1996. Voltage-dependent blockage of Ca(2+)-permeable AMPA receptors by joro spider toxin in cultured rat hippocampal neurones. *J Physiol* 496 ( Pt 2): 431-7.

Ikegaya, Y., H. Saito and K. Abe 1995. High-frequency stimulation of the basolateral amygdala facilitates the induction of long-term potentiation in the dentate gyrus in vivo. *Neurosci Res* 22(2): 203-7.

Ito, M. and M. Kano 1982. Long-lasting depression of parallel fiber-Purkinje cell transmission induced by conjunctive stimulation of parallel fibers and climbing fibers in the cerebellar cortex. *Neurosci Lett* 33(3): 253-8.

Ito, M., M. Sakurai and P. Tongroach 1982. Climbing fibre induced depression of both mossy fibre responsiveness and glutamate sensitivity of cerebellar Purkinje cells. *J Physiol* 324: 113-34.

Jacob, R. J., X. Fan, M. L. Evans, J. Dziura and R. S. Sherwin 2002. Brain glucose levels are elevated in chronically hyperglycemic diabetic rats: no evidence for protective adaptation by the blood brain barrier. *Metabolism* 51(12): 1522-4.

Kamal, A., G. J. Biessels, S. E. Duis and W. H. Gispen 2000. Learning and hippocampal synaptic plasticity in streptozotocin-diabetic rats: interaction of diabetes and ageing. *Diabetologia* 43(4): 500-6.

Kamal, A., G. J. Biessels, I. J. Urban and W. H. Gispen 1999. Hippocampal synaptic plasticity in streptozotocin-diabetic rats: impairment of long-term potentiation and facilitation of long-term depression. *Neuroscience* 90(3): 737-45.

Kar, S., R. Quirion and A. Parent 1994. An interaction between inositol hexakisphosphate (IP6) and insulin-like growth factor II receptor binding sites in the rat brain. *Neuroreport* 5(5): 625-8.

Kauer, J. A., R. C. Malenka and R. A. Nicoll 1988. A persistent postsynaptic modification mediates long-term potentiation in the hippocampus. *Neuron* 1(10): 911-7.

Kemp, N. and Z. I. Bashir 2001. Long-term depression: a cascade of induction and expression mechanisms. *Prog Neurobiol* 65(4): 339-65.

Knudsen, G. M., J. Jakobsen, D. I. Barry, A. M. Compton and D. R. Tomlinson 1989. Myo-inositol normalizes decreased sodium permeability of the blood-brain barrier in streptozotocin diabetes. *Neuroscience* 29(3): 773-7.

Krzywkowski, P., O. Ghribi, J. Gagne, C. Chabot, S. Kar, J. Rochford, G. Massicotte and J. Poirier 1999. Cholinergic systems and long-term potentiation in memory-impaired apolipoprotein E-deficient mice. *Neuroscience* 92(4): 1273-86.

Laezza, F., J. J. Doherty and R. Dingledine 1999. Long-term depression in hippocampal interneurons: joint requirement for pre- and postsynaptic events. *Science* 285(5432): 1411-4.

Larsson, O., C. J. Barker, A. Sj-oholm, H. Carlqvist, R. H. Michell, A. Bertorello, T. Nilsson, R. E. Honkanen, G. W. Mayr, J. Zwiller and P. O. Berggren 1997. Inhibition of phosphatases and increased  $\text{Ca}^{2+}$  channel activity by inositol hexakisphosphate. *Science* 278(5337): 471-4.

Lee, H. G., X. Zhu, H. A. Ghanbari, O. Ogawa, A. K. Raina, M. J. O'Neill, G. Perry and M. A. Smith 2002. Differential regulation of glutamate receptors in Alzheimer's disease. *Neurosignals* 11(5): 282-92.

Lee, S. H., L. Liu, Y. T. Wang and M. Sheng 2002. Clathrin adaptor AP2 and NSF interact with overlapping sites of GluR2 and play distinct roles in AMPA receptor trafficking and hippocampal LTD. *Neuron* 36(4): 661-74.

Leonard, A. S., M. A. Davare, M. C. Horne, C. C. Garner and J. W. Hell 1998. SAP97 is associated with the alpha-amino-3-hydroxy-5-methylisoxazole-4-propionic acid receptor GluR1 subunit. *J Biol Chem* 273(31): 19518-24.

Lerma, J., A. V. Paternain, A. Rodriguez-Moreno and J. C. Lopez-Garcia 2001. Molecular physiology of kainate receptors. *Physiol Rev* 81(3): 971-98.

Liao, D., N. A. Hessler and R. Malinow 1995. Activation of postsynaptically silent synapses during pairing-induced LTP in CA1 region of hippocampal slice. *Nature* 375(6530): 400-4.

Lissin, D. V., R. C. Carroll, R. A. Nicoll, R. C. Malenka and M. von Zastrow 1999. Rapid, activation-induced redistribution of ionotropic glutamate receptors in cultured hippocampal neurons. *J Neurosci* 19(4): 1263-72.

Lu, Y. J., Y. He and S. F. Sui 2002. Inositol hexakisphosphate (InsP6) can weaken the  $\text{Ca}^{2+}$ -dependent membrane binding of C2AB domain of synaptotagmin I. *FEBS Lett* 527(1-3): 22-6.

Lynch, D. R. and R. P. Guttman 2002. Excitotoxicity: perspectives based on N-methyl-D-aspartate receptor subtypes. *J Pharmacol Exp Ther* 300(3): 717-23.

Lynch, M. A., M. P. Clements, K. L. Voss, C. R. Bramham and T. V. Bliss 1991. Is arachidonic acid a retrograde messenger in long-term potentiation? *Biochem Soc Trans* 19(2): 391-6.

Lynch, M. A., M. L. Errington and T. V. Bliss 1989. Nordihydroguaiaretic acid blocks the synaptic component of long-term potentiation and the associated increases in release of glutamate and arachidonate: an in vivo study in the dentate gyrus of the rat. *Neuroscience* 30(3): 693-701.

Maccaferri, G. and C. J. McBain 1996. Long-term potentiation in distinct subtypes of hippocampal nonpyramidal neurons. *J Neurosci* 16(17): 5334-43.



- Maccioni, R. B., J. P. Munoz and L. Barbeito 2001. The molecular bases of Alzheimer's disease and other neurodegenerative disorders. *Arch Med Res* 32(5): 367-81.
- Malenka, R. C. 1994. Synaptic plasticity in the hippocampus: LTP and LTD. *Cell* 78(4): 535-8.
- Malenka, R. C. and R. A. Nicoll 1999. Long-term potentiation--a decade of progress? *Science* 285(5435): 1870-4.
- Man, H. Y., J. W. Lin, W. H. Ju, G. Ahmadian, L. Liu, L. E. Becker, M. Sheng and Y. T. Wang 2000. Regulation of AMPA receptor-mediated synaptic transmission by clathrin-dependent receptor internalization. *Neuron* 25(3): 649-62.
- Masliah, E., M. Mallory, N. Ge, M. Alford, I. Veinbergs and A. D. Roses 1995. Neurodegeneration in the central nervous system of apoE-deficient mice. *Exp Neurol* 136(2): 107-22.
- Masliah, E., W. Samuel, I. Veinbergs, M. Mallory, M. Mante and T. Saitoh 1997. Neurodegeneration and cognitive impairment in apoE-deficient mice is ameliorated by infusion of recombinant apoE. *Brain Res* 751(2): 307-14.
- Massicotte, G. 2000. Modification of glutamate receptors by phospholipase A2: its role in adaptive neural plasticity. *Cell Mol Life Sci* 57(11): 1542-50.
- Massicotte, G. and M. Baudry 1990. Modulation of DL-alpha-amino-3-hydroxy-5-methylisoxazole-4-propionate (AMPA)/quisqualate receptors by phospholipase A2 treatment. *Neurosci Lett* 118(2): 245-8.
- Massicotte, G., M. W. Oliver, G. Lynch and M. Baudry 1990. Effect of bromophenacyl bromide, a phospholipase A2 inhibitor, on the induction and maintenance of LTP in hippocampal slices. *Brain Res* 537(1-2): 49-53.
- Massicotte, G., P. Vanderklish, G. Lynch and M. Baudry 1991. Modulation of DL-alpha-amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionic acid/quisqualate receptors by phospholipase A2: a necessary step in long-term potentiation? *Proc Natl Acad Sci U S A* 88(5): 1893-7.
- Matsuda, S., S. Mikawa and H. Hirai 1999. Phosphorylation of serine-880 in GluR2 by protein kinase C prevents its C terminus from binding with glutamate receptor-interacting protein. *J Neurochem* 73(4): 1765-8.
- McBain, C. J., T. F. Freund and I. Mody 1999. Glutamatergic synapses onto hippocampal interneurons: precision timing without lasting plasticity. *Trends Neurosci* 22(5): 228-35.

- McDonald, B. J., H. J. Chung and R. L. Huganir 2001. Identification of protein kinase C phosphorylation sites within the AMPA receptor GluR2 subunit. *Neuropharmacology* 41(6): 672-9.
- McLaurin, J., R. Golomb, A. Jurewicz, J. P. Antel and P. E. Fraser 2000. Inositol stereoisomers stabilize an oligomeric aggregate of Alzheimer amyloid beta peptide and inhibit abeta -induced toxicity. *J Biol Chem* 275(24): 18495-502.
- McMahon, L. L. and J. A. Kauer 1997. Hippocampal interneurons express a novel form of synaptic plasticity. *Neuron* 18(2): 295-305.
- Medina, I., N. Filippova, G. Charton, S. Rougeole, Y. Ben-Ari, M. Khrestchatisky and P. Bregestovski 1995. Calcium-dependent inactivation of heteromeric NMDA receptor-channels expressed in human embryonic kidney cells. *J Physiol* 482 ( Pt 3): 567-73.
- Michaelis, E. K. 1998. Molecular biology of glutamate receptors in the central nervous system and their role in excitotoxicity, oxidative stress and aging. *Prog Neurobiol* 54(4): 369-415.
- Mikoshiba, K., M. Fukuda, K. Ibata, H. Kabayama and A. Mizutani 1999. Role of synaptotagmin, a  $\text{Ca}^{2+}$  and inositol polyphosphate binding protein, in neurotransmitter release and neurite outgrowth. *Chem Phys Lipids* 98(1-2): 59-67.
- Monaghan, D. T., D. Yao and C. W. Cotman 1984. Distribution of [3H]AMPA binding sites in rat brain as determined by quantitative autoradiography. *Brain Res* 324(1): 160-4.
- Montpied, P., F. de Bock, M. Baldy-Moulinier and G. Rondouin 1998. Alterations of metallothionein II and apolipoprotein J mRNA levels in kainate-treated rats. *Neuroreport* 9(1): 79-83.
- Morishita, W., J. H. Connor, H. Xia, E. M. Quinlan, S. Shenolikar and R. C. Malenka 2001. Regulation of synaptic strength by protein phosphatase 1. *Neuron* 32(6): 1133-48.
- Morris, R. G., E. Anderson, G. S. Lynch and M. Baudry 1986. Selective impairment of learning and blockade of long-term potentiation by an N-methyl-D-aspartate receptor antagonist, AP5. *Nature* 319(6056): 774-6.
- Mukherjee, B., J. R. Mukherjee and M. Chatterjee 1994. Lipid peroxidation, glutathione levels and changes in glutathione-related enzyme activities in streptozotocin-induced diabetic rats. *Immunol Cell Biol* 72(2): 109-14.
- Muller, D. and G. Lynch 1989. Evidence that changes in presynaptic calcium currents are not responsible for long-term potentiation in hippocampus. *Brain Res* 479(2): 290-9.

Muller, D., R. M. Nitsch, R. J. Wurtman and S. Hoyer 1998. Streptozotocin increases free fatty acids and decreases phospholipids in rat brain. *J Neural Transm* 105(10-12): 1271-81.

Myhrer, T. 2003. Neurotransmitter systems involved in learning and memory in the rat: a meta-analysis based on studies of four behavioral tasks. *Brain Res Brain Res Rev* 41(2-3): 268-87.

Ogimoto, G., G. A. Yudowski, C. J. Barker, M. Kohler, A. I. Katz, E. Feraille, C. H. Pedemonte, P. O. Berggren and A. M. Bertorello 2000. G protein-coupled receptors regulate Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase activity and endocytosis by modulating the recruitment of adaptor protein 2 and clathrin. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97(7): 3242-7.

Oitzl, M. S., M. Mulder, P. J. Lucassen, L. M. Havekes, J. Grootendorst and E. R. de Kloet 1997. Severe learning deficits in apolipoprotein E-knockout mice in a water maze task. *Brain Res* 752(1-2): 189-96.

O'Keefe, J. and L. Nadel (1978). The hippocampus as a cognitive map. Oxford, Clarendon Press.

Osten, P., L. Khatri, J. L. Perez, G. Kohr, G. Giese, C. Daly, T. W. Schulz, A. Wensky, L. M. Lee and E. B. Ziff 2000. Mutagenesis reveals a role for ABP/GRIP binding to GluR2 in synaptic surface accumulation of the AMPA receptor. *Neuron* 27(2): 313-25.

Ozawa, S., H. Kamiya and K. Tsuzuki 1998. Glutamate receptors in the mammalian central nervous system. *Prog Neurobiol* 54(5): 581-618.

Palmer, G. C. 2001. Neuroprotection by NMDA receptor antagonists in a variety of neuropathologies. *Curr Drug Targets* 2(3): 241-71.

Parent, A. and R. Quirion 1994. Differential localization and pH dependency of phosphoinositide 1,4,5-IP<sub>3</sub>, 1,3,4,5-IP<sub>4</sub> and IP<sub>6</sub> receptors in rat and human brains. *Eur J Neurosci* 6(1): 67-74.

Patrick, C. B., P. Krzywkowski, C. Ramassamy, J. Poirier, S. I. Rapoport and E. J. Murphy 2000. Phospholipase A<sub>2</sub> activity is decreased selectively in the hippocampus of aged apolipoprotein E deficient mice. *Neurosci Lett* 288(3): 211-4.

Pellegrini-Giampietro, D. E., R. S. Zukin, M. V. Bennett, S. Cho and W. A. Pulsinelli 1992. Switch in glutamate receptor subunit gene expression in CA1 subfield of hippocampus following global ischemia in rats. *Proc Natl Acad Sci U S A* 89(21): 10499-503.

Perez, J. L., L. Khatri, C. Chang, S. Srivastava, P. Osten and E. B. Ziff 2001. PICK1 targets activated protein kinase Calpha to AMPA receptor clusters in spines of hippo-

campal neurons and reduces surface levels of the AMPA-type glutamate receptor subunit 2. *J Neurosci* 21(15): 5417-28.

Perez, Y., F. Morin and J. C. Lacaille 2001. A hebbian form of long-term potentiation dependent on mGluR1a in hippocampal inhibitory interneurons. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98(16): 9401-6.

Poirier, J. 1994. Apolipoprotein E in animal models of CNS injury and in Alzheimer's disease. *Trends Neurosci* 17(12): 525-30.

Prasad, M. R., M. A. Lovell, M. Yatin, H. Dhillon and W. R. Markesbery 1998. Regional membrane phospholipid alterations in Alzheimer's disease. *Neurochem Res* 23(1): 81-8.

Purves, D. and A. Roucoux (1999). Neurosciences. Paris ; Bruxelles, De Boeck Université.

Ramassamy, C., D. Averill, U. Beffert, L. Theroux, S. Lussier-Cacan, J. S. Cohn, Y. Christen, A. Schoofs, J. Davignon and J. Poirier 2000. Oxidative insults are associated with apolipoprotein E genotype in Alzheimer's disease brain. *Neurobiol Dis* 7(1): 23-37.

Represa, A., E. Tremblay and Y. Ben-Ari 1987. Kainate binding sites in the hippocampal mossy fibers: localization and plasticity. *Neuroscience* 20(3): 739-48.

Ryan, C. M. 1988. Neurobehavioral complications of type I diabetes. Examination of possible risk factors. *Diabetes Care* 11(1): 86-93.

Saiardi, A., E. Nagata, H. R. Luo, A. M. Snowman and S. H. Snyder 2001. Identification and characterization of a novel inositol hexakisphosphate kinase. *J Biol Chem* 276(42): 39179-85.

Sasakawa, N., M. Sharif and M. R. Hanley 1995. Metabolism and biological activities of inositol pentakisphosphate and inositol hexakisphosphate. *Biochem Pharmacol* 50(2): 137-46.

Sattler, R. and M. Tymianski 2000. Molecular mechanisms of calcium-dependent excitotoxicity. *J Mol Med* 78(1): 3-13.

Shen, L., F. Liang, L. D. Walensky and R. L. Huganir 2000. Regulation of AMPA receptor GluR1 subunit surface expression by a 4. 1N-linked actin cytoskeletal association. *J Neurosci* 20(21): 7932-40.

Sheng, M. and M. J. Kim 2002. Postsynaptic signaling and plasticity mechanisms. *Science* 298(5594): 776-80.

Soderling, T. R. and V. A. Derkach 2000. Postsynaptic protein phosphorylation and LTP. *Trends Neurosci* 23(2): 75-80.

Sommer, B., K. Keinänen, T. A. Verdoorn, W. Wisden, N. Burnashev, A. Herb, M. Kohler, T. Takagi, B. Sakmann and P. H. Seeburg 1990. Flip and flop: a cell-specific functional switch in glutamate-operated channels of the CNS. *Science* 249(4976): 1580-5.

Song, I. and R. L. Huganir 2002. Regulation of AMPA receptors during synaptic plasticity. *Trends Neurosci* 25(11): 578-88.

Song, I., S. Kamboj, J. Xia, H. Dong, D. Liao and R. L. Huganir 1998. Interaction of the N-ethylmaleimide-sensitive factor with AMPA receptors. *Neuron* 21(2): 393-400.

Squire, L. R. and E. R. Kandel (2002). La mémoire : de l'esprit aux molécules. Bruxelles, De Boeck Université.

Standley, S., G. Tocco, N. Wagle and M. Baudry 1998. High- and low-affinity alpha-[3H]amino-3-hydroxy-5-methylisoxazole-4-propionic acid ([3H]AMPA) binding sites represent immature and mature forms of AMPA receptors and are composed of differentially glycosylated subunits. *J Neurochem* 70(6): 2434-45.

Stokes, C. E., K. R. Gillon and J. N. Hawthorne 1983. Free and total lipid myo-inositol concentrations decrease with age in human brain. *Biochim Biophys Acta* 753(1): 136-8.

Strachan, M. W., I. J. Deary, F. M. Ewing and B. M. Frier 1997. Is type II diabetes associated with an increased risk of cognitive dysfunction? A critical review of published studies. *Diabetes Care* 20(3): 438-45.

Swope, S. L., S. I. Moss, L. A. Raymond and R. L. Huganir 1999. Regulation of ligand-gated ion channels by protein phosphorylation. *Adv Second Messenger Phosphoprotein Res* 33: 49-78.

Teter, B. and J. W. Ashford 2002. Neuroplasticity in Alzheimer's disease. *J Neurosci Res* 70(3): 402-37.

Theibert, A. B., V. A. Estevez, C. D. Ferris, S. K. Danoff, R. K. Barrow, G. D. Prestwich and S. H. Snyder 1991. Inositol 1,3,4,5-tetrakisphosphate and inositol hexakisphosphate receptor proteins: isolation and characterization from rat brain. *Proc Natl Acad Sci U S A* 88(8): 3165-9.

Timerman, A. P., M. M. Mayrleitner, T. J. Lukas, C. C. Chadwick, A. Saito, D. M. Watterson, H. Schindler and S. Fleischer 1992. Inositol polyphosphate receptor and clathrin assembly protein AP-2 are related proteins that form potassium-selective ion channels in planar lipid bilayers. *Proc Natl Acad Sci U S A* 89(19): 8976-80.

- Tocco, G., G. Massicotte, S. Standley, R. F. Thompson and M. Baudry 1992. Phospholipase A2-induced changes in AMPA receptor: an autoradiographic study. *Neuroreport* 3(6): 515-8.
- Uno, M. and N. Ozawa 1991. Long-term potentiation of the amygdalo-striatal synaptic transmission in the course of development of amygdaloid kindling in cats. *Neurosci Res* 12(1): 251-62.
- Valastro, B., J. Cossette, N. Lavoie, S. Gagnon, F. Trudeau and G. Massicotte 2002. Up-regulation of glutamate receptors is associated with LTP defects in the early stages of diabetes mellitus. *Diabetologia* 45(5): 642-50.
- Valastro, B., O. Ghribi, J. Poirier, P. Krzywkowski and G. Massicotte 2001. AMPA receptor regulation and LTP in the hippocampus of young and aged apolipoprotein E-deficient mice. *Neurobiol Aging* 22(1): 9-15.
- Valastro, B., M. Girard, J. Gagne, F. Martin, A. T. Parent, M. Baudry and G. Massicotte 2001. Inositol hexakisphosphate-mediated regulation of glutamate receptors in rat brain sections. *Hippocampus* 11(6): 673-82.
- Veinbergs, I., M. W. Jung, S. J. Young, E. Van Uden, P. M. Groves and E. Masliah 1998. Altered long-term potentiation in the hippocampus of apolipoprotein E-deficient mice. *Neurosci Lett* 249(2-3): 71-4.
- Veinbergs, I. and E. Masliah 1999. Synaptic alterations in apolipoprotein E knockout mice. *Neuroscience* 91(1): 401-3.
- Verdoorn, T. A., N. Burnashev, H. Monyer, P. H. Seeburg and B. Sakmann 1991. Structural determinants of ion flow through recombinant glutamate receptor channels. *Science* 252(5013): 1715-8.
- Voglmaier, S. M., J. H. Keen, J. E. Murphy, C. D. Ferris, G. D. Prestwich, S. H. Snyder and A. B. Theibert 1992. Inositol hexakisphosphate receptor identified as the clathrin assembly protein AP-2. *Biochem Biophys Res Commun* 187(1): 158-63.
- Wang, Y. T., X. M. Yu and M. W. Salter 1996. Ca(2+)-independent reduction of N-methyl-D-aspartate channel activity by protein tyrosine phosphatase. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93(4): 1721-5.
- Weisgraber, K. H., A. D. Roses and W. J. Strittmatter 1994. The role of apolipoprotein E in the nervous system. *Curr Opin Lipidol* 5(2): 110-6.
- Wentholt, R. J., K. Prybylowski, S. Standley, N. Sans and R. S. Petralia 2003. Trafficking of nmda receptors. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 43: 335-58.

- Wesierska, M., R. Macias-Gonzalez and J. Bures 1990. Differential effect of ketamine on the reference and working memory versions of the Morris water maze task. *Behav Neurosci* 104(1): 74-83.
- Williams, J. H., M. L. Errington, M. A. Lynch and T. V. Bliss 1989. Arachidonic acid induces a long-term activity-dependent enhancement of synaptic transmission in the hippocampus. *Nature* 341(6244): 739-42.
- Wong, R. K., R. Bianchi, G. W. Taylor and L. R. Merlin 1999. Role of metabotropic glutamate receptors in epilepsy. *Adv Neurol* 79: 685-98.
- Wyszynski, M., J. Lin, A. Rao, E. Nigh, A. H. Beggs, A. M. Craig and M. Sheng 1997. Competitive binding of alpha-actinin and calmodulin to the NMDA receptor. *Nature* 385(6615): 439-42.
- Xia, J., X. Zhang, J. Staudinger and R. L. Huganir 1999. Clustering of AMPA receptors by the synaptic PDZ domain-containing protein PICK1. *Neuron* 22(1): 179-87.
- Yang, S. N., J. Yu, G. W. Mayr, F. Hofmann, O. Larsson and P. O. Berggren 2001. Inositol hexakisphosphate increases L-type  $\text{Ca}^{2+}$  channel activity by stimulation of adenylyl cyclase. *Faseb J* 15(10): 1753-63.
- Yatsugi, S., M. Takahashi, S. Kawasaki-Yatsugi, K. Koshiya, S. Sakamoto, D. Uematsu and M. Shimizu-Sasamata 1996. Neuroprotective effect of YM90K, a novel AMPA/kainate receptor antagonist, in focal cerebral ischemia in cats. *J Cereb Blood Flow Metab* 16(5): 959-66.
- Yorek, M. A., J. Dunlap, M. Stefani and E. Davidson 1993. Increased glucose concentration inhibits myo-inositol metabolism by two different mechanisms in cultured mammalian cells. *Diabet Med* 10 Suppl 2: 21S-26S.
- Yorek, M. A., J. A. Dunlap, M. R. Stefani and E. P. Davidson 1993. Reversal of hyperglycemic-induced defects in myo-inositol metabolism and  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  pump activity in cultured neuroblastoma cells by normalizing glucose levels. *Metabolism* 42(9): 1180-9.
- Yorek, M. A., T. J. Wiese, E. P. Davidson, J. A. Dunlap, M. R. Stefani, C. E. Conner, S. A. Lattimer, M. Kamijo, D. A. Greene and A. A. Sima 1993. Reduced motor nerve conduction velocity and  $\text{Na}^+(\text{+})\text{-K}^+(\text{+})\text{-ATPase}$  activity in rats maintained on L-fucose diet. Reversal by myo-inositol supplementation. *Diabetes* 42(10): 1401-6.
- Yoshioka, A., M. Hardy, D. P. Younkin, J. B. Grinspan, J. L. Stern and D. Pleasure 1995. Alpha-amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionate (AMPA) receptors mediate excitotoxicity in the oligodendroglial lineage. *J Neurochem* 64(6): 2442-8.

Zeevalk, G. D., D. Schoepp and W. J. Nicklas 1995. Excitotoxicity at both NMDA and non-NMDA glutamate receptors is antagonized by aurointricarboxylic acid: evidence for differing mechanisms of action. *J Neurochem* 64(4): 1749-58.

Zhuo, M., S. A. Small, E. R. Kandel and R. D. Hawkins 1993. Nitric oxide and carbon monoxide produce activity-dependent long-term synaptic enhancement in hippocampus. *Science* 260(5116): 1946-50.

Zucker, R. S. 1989. Short-term synaptic plasticity. *Annu Rev Neurosci* 12: 13-31.